



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**MicroRNAs diferencialmente expresados en cáncer  
de tiroides: funciones de miR-146b y miR-30a en la  
diferenciación y progresión tumoral tiroidea**

TESIS DOCTORAL  
LEÓN WERT LAMAS  
MADRID 2016





DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**MicroRNAs diferencialmente expresados en cáncer de  
tiroides: funciones de miR-146b y miR-30a en la  
diferenciación y progresión tumoral tiroidea**

**Memoria que presenta el licenciado en Veterinaria León Wert Lamas para optar  
al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.**

**Directores de tesis: Pilar Santisteban Sanz y Garcilaso Riesco-Eizaguirre**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”**







Los Doctores Pilar Santisteban Sanz, Profesora de Investigación del CSIC en el instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Madrid y Garcilaso Riesco-Eizaguirre, Médico Adjunto del Hospital Universitario de Móstoles (Madrid)

**AUTORIZAN:** la presentación de la tesis doctoral titulada: "MicroRNAs diferencialmente expresados en cáncer de tiroides: funciones de miR-146b y miR-30a en la diferenciación y progresión tumoral tiroidea" realizada bajo nuestra dirección, por el Licenciado en Veterinaria León Wert Lamas.

En esta memoria de tesis doctoral se ha analizado, mediante secuenciación masiva, el miRnoma del carcinoma papilar de tiroides, identificando microRNAs (miRs) que están desregulados en ese tipo tumoral. Mediante ensayos funcionales se ha caracterizado el papel de dos de ellos en los procesos de diferenciación, principalmente en la regulación del transportador de yodo, y en la progresión tumoral de la célula folicular tiroidea. Se han analizado las vías de señalización implicadas en estos mecanismos y se ha descrito el papel de la proteína LIN28B.

El conocer el papel de los miRs en cáncer de tiroides contribuirá no sólo a un mayor conocimiento de esta patología sino que ayudará a un mejor diagnóstico de esta entidad tumoral. Además consideramos que estos resultados podrían ser explotados terapéuticamente para modular la diferenciación celular tiroidea y la captación de yoduro para mejorar el tratamiento del cáncer de tiroides avanzado

El trabajo realizado por el doctorando ha sido de gran calidad demostrando su responsabilidad científica, su dedicación al trabajo y un juicio crítico muy necesario en la búsqueda de nuevos conocimientos científicos. Ha demostrado por tanto que tiene la formación investigadora necesaria para que este trabajo sea presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

Y para que conste a efectos oportunos se expide el presente certificado en  
Madrid a 2 de Febrero de 2016



## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecerle a mi directora de tesis Pilar Santisteban por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Gracias, Pilar, por haberme enseñado pacientemente tanto (de tanto), por haberme dado el apoyo y las oportunidades necesarias para desarrollar mis propias ideas y crecer como científico. Por tu liderazgo tranquilo, por el buen ambiente. Y por todos los buenos momentos juntos de viajes, vinos, celebraciones y grandes comilonas con Edu, un grande.

Quiero agradecer también a mi codirector de tesis Garcilaso Riesco-Eizaguirre, por todo su apoyo, dedicación y enseñanzas en estos años. No sólo por haberme formado técnicamente, sino por compartir esa ilusión por la ciencia que ha sido tan inspiradora para mí.

Aunque asomarse al mundo de la regulación génica, y atisbar la abrumadora complejidad que emana de ella, haya sido realmente apasionante, mucho menos apasionante e infinitamente más difícil hubiera sido si no hubiese compartido estos 4 años con gente tan increíble tanto en el 2.9 como en el IIB en general.

Quiero agradecer a ese primer grupo del 2.9 que ya no está y que tanto compartimos. A Ana por la infinita ayuda brindada para resolver cualquier situación cualquier día a cualquier hora, una crack de la ciencia, por los buenos momentos en Granada y NY, vuelve ya, que te echamos de menos. Christian con tus bromas, y tus lecciones de clonajes que tanto me ayudaron. A Suzana con tus inquietudes vitales y tu visión inconformista de la vida. A Antonio, por tu disposición y dedicación a compartir tu sabiduría, por toda la ayuda en los ensayos de captación en sesión nocturna. A David y las infinitas charlas de la vida al salir del labo. Siempre te quedará un reloj en Madrid, David, no se te olvide venir a buscarlo. A Lara, Laris, Larilástica, mi gran psicóloga, amiga y consultora científica. Muchas gracias por tu apoyo, tus consejos y tu risa contagiosa. A Dani, Alberto y Jasmín, por las Maxis y las bromas locas. También quiero agradecer a los miembros actuales del 2.9 por su inestimable ayuda y apoyo y por hacer del labo un lugar genial donde currar. A Jesús y Miguel, por su paciencia, su sed de conocimiento y su disposición a analizar siempre cualquier duda y encontrar una solución. A Celiocita, Carlos y Carol, por proponer siempre planes divertidos y por haber dado un aire tan lúdico a las comidas y reuniones del labo, seguid así. A Adri que, además de todo lo anterior, me rescata de mi despiste avisándome de seminarios, comidas y planes. Además quiero agradecer muy especialmente a Andrea y Julie por haber colaborado siempre con mucha determinación y ser unas currantas. Agradezco mucho la paciencia en los días malos. Espero que pronto estemos celebrando alguna publicación juntos. Gracias, chicas. A Aris, mi compañero oficial de congresos, por todos esos grandes días de inspiración diurna y destilación nocturna. San Petersburgo 2016 nos espera, que todavía tengo mucho que aprender de la feria.

A Pilucky Lucky, la más divertida y optimista del iib, siempre con tu gran sonrisa lista para levantar el ánimo, eres una crack de la vida. A Meryjane Watson, un huracán metido en un cuerpo de 45 kilos, una virtuosa del blues, una compañera escandalosa y una amiga estupenda, grandes momentos de biblioteca juntos. Y muy especialmente para Petrushkin, Petronila, Petrina la divina. Has sido uno de los apoyos más importantes durante mi tesis, te agradezco infinitamente, todos los buenos momentos, los bailes y conciertos, las comidas, las confesiones, un *troubleshooting* vital y permanente. Sigue tan divertida.

A las *guadañas* y las *escalantas* por esas supercomidas geográficas: Filipaso, Sol, Sandra, Espindolina... A los territorios inexplorados del Este que tanto me han ayudado siempre: Yuri, Andrea, Lucía. A mis compis de biblioteca Boludita y Micalvita por haber hecho más agradables las horas. A los Servicios pero muy especialmente a Javi por todas las miles de horas haciendo figuras y hablando del Atleti. A Diego y a Carlos por toda la lata que les he dado.

Tampoco me puedo olvidar de mi estancia en Boston, que ha tenido un peso muy importante

tanto en mi trabajo como en mi vida. Así, agradezco a mi jefe de estancia del departamento de Química Biológica de Harvard, Richard Gregory por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y a mis compañeros Robinson Triboulet, Mehdi Pirouz y Dejan Maglic por haberme ayudado y enseñado tanto. A Jesús y Vanesa por haberme acogido en su casa tantas noches de cenas y vinos.

También me acuerdo en estos momentos de aquellos docentes que han influido muy positivamente en mi desarrollo científico y humano: Así, las enseñanzas e inspiradora influencia de Carmen Gutiérrez, Jens Rohwer, Mayte Cutuli, Bruno G. Zorn, JM Alunda, Antonio Osuna y Alfredo Toraño han sido determinantes en los últimos años.

Y por último a la gente que me ha ayudado a estar siempre feliz también fuera del iib en estos últimos años. Así les agradezco a mis compañeros de swing Noemí, Agus, Menchu y Javi; a mi grupo de superVets, a los guaridenses-fieras, cervantinos-alemanes, Tundro-sportinguistas y demás fauna. A Laura, por ser tan buena persona, por haberme cuidado tanto, haber sido mi mayor apoyo en estos últimos años y haberme dado tantos momentos mágicos. A Carmelen, ánimo en estos momentos tan difíciles, ójala te pongas mejor y podamos volver a hacer planes divertidos juntos. A mi padre, un gran padre, por tu sentido de la justicia, tu sensibilidad social, tu apoyo perenne, tu curiosidad por el saber, por haberme descubierto tantas cosas y haberme enseñado a reírme de la vida. A mi madre, por tu apoyo y amor incondicional, por haberme transmitido la importancia de la dedicación, del estudio y del conocimiento, el amor por los idiomas y la lingüística -hermanos de la genética y la computación-, la fascinación por viajar y por conocer. Por ser la mejor madre del mundo.

Muchas gracias a todos.

## Resumen

Para caracterizar integralmente el transcriptoma y específicamente el miRNoma en el carcinoma tiroideo, realizamos un análisis de expresión génica, por secuenciación masiva, de 8 carcinomas papilares tiroideos (CPT) y de su tejido tiroideo adyacente sano.

Basándonos en predicciones bioinformáticas de potenciales dianas, hemos descrito una red de regulación que relaciona los genes más infraexpresados con los miRNAs más sobreexpresados en CPT. También hemos identificado un conjunto de miRNAs sobreexpresados que tienen elementos de reconocimiento en los 3'UTR de genes esenciales para la diferenciación tiroidea como NIS, TPO, TSHR, PAX8 and NKX2-1. Entre estos miRNAs observamos que el miR-146b-3p -un miR cuyas dos hebras estaban entre las más sobreexpresadas en CPT- tenía como potenciales dianas a varios de estos genes. Mediante ensayos funcionales demostramos que el miR-146b-3p reduce los niveles proteicos NIS, PAX8 y FOXE1. Además, demostramos que tanto la inhibición sobre NIS, como PAX8, es ejercida a través de la unión a su 3'UTR. Estos datos indican que la sobreexpresión tumoral de miR-146b-3p contribuye a la dediferenciación tiroidea y en especial a la pérdida de la función de NIS mediante al menos 2 mecanismos complementarios: i) una regulación postranscripcional directa y ii) mediante el silenciamiento de PAX8 y FOXE1. El resultado global, fue una reducción significativa en la captación de yodo.

Por otra parte, hemos identificado al supresor tumoral PTEN como una nueva diana de miR-146b-5 en el carcinoma tiroideo. La sobreexpresión del miR-146b redujo los niveles proteicos de PTEN mediante la unión a su 3'UTR promoviendo la hiperactivación oncogénica de la vía PI3K. Además, hemos demostrado que la sobreexpresión del miR-146b redujo los niveles nucleares de FOXO1 y p27 e incrementó los niveles de BCL-2. Inversamente, nuestros resultados mostraron que, tanto el oncogén RAS como el efector de la PI3K IGF-1, incrementaron la expresión del miR-146b. Así, en este trabajo proveemos de un nuevo mecanismo explicativo para: i) la actividad prooncogénica del miR-146b y ii) la reducción de PTEN observada en los tumores tiroideos.

Por último, en este trabajo hemos descrito un eje regulatorio entre el miR-30a, uno de los más infraexpresados en CPT y la proteína oncofetal de unión a RNA, LIN28B. Nuestros resultados indican que ambos miembros se reprimen mutuamente y que comparten dianas comunes a las que regulan inversamente. También, confirmamos que la inhibición ejercida por el miR-30a sobre LIN28B está mediada por su 3'UTR. Por otra parte, determinamos los niveles de proteína de LIN28B en un panel de líneas celulares de carcinomas tiroideos y observamos que su expresión estaba relacionada con la existencia de mutaciones activadoras de la vía PI3K en líneas derivadas de carcinoma anaplásico. Además, validamos como dianas del eje a los inductores de la transición epitelio mesénquima HMGA2, SIX1 y EYA1, y a los efectores de la vía PI3K RAS, PI3K $\beta$ , BCL-2, CDK6 y p27(Kip). El efecto a nivel celular de la expresión del miR-30a fue una reducción de la invasión y la proliferación en las líneas celulares tiroideas. Inversamente, la sobreexpresión de LIN28B. Nuestros resultados indican la existencia de un eje LIN28B/miR-30a, de retroalimentación negativa doble, cuya desregulación oncogénica conlleva al silenciamiento del miR-30a y a la expresión aberrante de LIN28B contribuyendo a la progresión tumoral tiroidea.

## Summary

To comprehensively characterize microRNA (miR) and mRNA expression in thyroid cancer, we performed next-generation sequencing expression analysis of 8 papillary thyroid carcinomas (PTC) with paired samples of normal thyroid tissue.

In this work, we identified, based on computational predictions of potential targets, a network relating the most abundant overexpressed miRs with the most downregulated targets in PTC. Also, we identified a set of upregulated microRNAs that target genes essential for thyroid differentiation (or thyroid iodide-metabolizing genes), such as NIS, TPO, TSHR, PAX8 and NKX2-1. Among these microRNAs, we found miR-146b-3p -a miR whose both strands were among the most highly overexpressed miRs in thyroid tumors - to putatively inhibit several of them. Performing functional studies we demonstrated that miR-146b-3p reduces NIS, PAX8, and FOXE1 protein expression. Furthermore, we unveiled that both NIS and PAX8 inhibitions are specifically exerted through a direct binding to their 3'UTRs. These data suggest that tumor overexpression of miR-146b-3p widely contributes to thyroid dedifferentiation and specially to NIS loss of function through at least two complementary mechanisms: (i) direct postranscriptional level, and (ii) through PAX8 and FOXE1 silencing. The general outcome was a significant decrease in iodide uptake in miR-146b-3p overexpressing cells.

Furthermore, we identified the tumor suppressor PTEN as a novel target of miR-146b-5 in thyroid cancer. MiR-146b decreased PTEN mRNA and protein levels by direct binding to its 3'UTR promoting tumoral hyperactivation of PI3K/AKT pathway. Additionally, mir-146b overexpressing cells showed decreased FOXO1 and p27 nuclear levels, and an increase of total BCL-2, mediating higher proliferation and survival rates. Conversely, our results showed that both constitutive overexpression of RAS and treatment with PI3K pathway effector IGF-1 resulted in increased expression of mir-146b in thyroid follicular cells. Thus, we provide a new mechanism to explain how miR-146b leads to a more aggressive tumoral behavior and an explanation on why PTEN levels are reduced in thyroid carcinomas.

Next, we described a novel regulatory axis composed by PTC downregulated miR-30a and the oncofetal miRNA-binding protein LIN28B. Thus, we demonstrated that both members repress each other's expression and have a common pool of targets, which are inversely regulated by each of the axis members. Mir-30a-mediated LIN28B repression was found to be exerted by direct binding to its 3'UTR. We determined the expression levels of LIN28B in a panel of thyroid carcinoma cell lines and we showed it was linked to PI3K hyperactivating mutations in ATC derived cells. Moreover, we validated EMT inducers HMGA2, SIX1 and EYA1 and PI3K effectors RAS, PI3K $\beta$ , BCL-2, CDK6 and p27(Kip) as targets regulated by the axis. The general outcome was a significant decrease in invasion and proliferation in mir-30a overexpressing cells and, conversely, an increase in these parameters in LIN28B overexpressing cells. These data suggest the existence of a LIN28B/30a axis, with a double negative feedback regulation, whose tumoral shift, leading to overexpression of LIN28B and silencing of mir-30a, widely contributes to thyroid cancer progression.



## Índice



<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>1.- La glándula tiroidea</b> .....	9
1.1.- Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas .....	10
1.2.- Señales extracelulares implicadas en el control de la célula tiroidea.....	11
1.2.1.- La tirotropina (TSH) .....	11
1.2.2.- Vías de señalización alternativas activadas por TSH.....	12
1.2.3.- El factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1).....	13
1.3.- Regulación de la proliferación en la célula folicular tiroidea .....	15
1.3.1.- Estímulos proliferativos: TSH e IGF1.....	15
1.4.- La diferenciación en la célula folicular tiroidea.....	16
1.4.1.- TSH .....	16
1.4.2.- IGF1 .....	17
1.4.3.- PAX8 .....	17
1.4.4.- NIS .....	18
1.4.4.1- Regulación de NIS .....	18
1.4.4.2- Vías de señalización implicadas en la regulación de NIS .....	19
1.4.4.3- Regulación postranscripcional de NIS .....	19
<b>2.- Cáncer de tiroides</b> .....	20
2.1.- Clasificación .....	20
2.2.- Alteraciones moleculares en cáncer de tiroides .....	22
2.3.- Progresión tumoral y transición epitelio mesénquima .....	23
<b>3.- MicroRNAs</b> .....	25
3.1.- Función y mecanismos de acción .....	25
3.2.- Biogénesis .....	26
3.3.- MiRNAs en cáncer de tiroides .....	27
<b>4.- LIN28</b> .....	28
4.1.- Mecanismos de acción .....	28
4.1.1.- Mecanismos dependientes de la inhibición de Let-7 .....	29
4.1.2.- Mecanismos Let-7 independientes: Regulación por unión directa al mRNA.	30
.....	30
4.2.- LIN28 en cáncer .....	30
<b>OBJETIVOS</b> .....	31

<b>MATERIALES y MÉTODOS</b>	35
<b>1.- Materiales</b>	37
1.1.- Oligonucleótidos	37
1.2.- Anticuerpos	40
1.3.- Plásmidos	40
1.4.- Líneas celulares	41
1.5.- Muestras tisulares tiroideas	43
<b>2.- Métodos</b>	43
2.1.- Cultivos celulares	43
2.2.- Métodos de determinación de niveles de RNA	44
2.2.1.- Extracción de RNA	44
2.2.2.- RT-PCR	44
2.2.3.- PCR cuantitativa (qPCR)	45
2.2.4.- Secuenciación de última generación	45
2.3.- Métodos de determinación de niveles de proteína	47
2.3.1.- Extracción de proteínas	47
2.3.2.- Western Blot e Inmunodetección	47
2.3.3.- Inmunofluorescencia celular	48
2.4.- Generación de líneas celulares estables	48
2.5.- Transfecciones transitorias	49
2.6.- Ensayo de proliferación	49
2.7.- Ensayo de captación de yodo	50
2.8.- Ensayo de invasividad en matrigel	50
2.9.- Evaluación del ciclo celular	51
2.10.- Predicción bioinformática de los genes diana	51
2.11.- Análisis estadístico	51
 <b>RESULTADOS</b>	 53
<b>1.- Descripción de un circuito regulatorio miR-146b-3p/PAX8/NIS que modula la diferenciación tiroidea</b>	55
1.1.- Determinación de los miRNomas tiroideos normales y de CPT por secuenciación masiva	55
1.1.1.- Identificación de los miRs funcionales más desregulados en este carcinoma tiroideo	57
1.2.- Caracterización del transcriptoma normal y tumoral tiroideo	58

1.2.1.- Identificación de una red reguladora de miRs sobreexpresados involucrada en procesos biológicos esenciales como la diferenciación tiroidea .....	60
1.3.-PAX8 y miR-146b cooperan en la regulación de dianas comunes y se regulan mutuamente.....	65
1.4.-La expresión del miR-146b-3p disminuye la captación de yodo impidiendo la traducción de NIS a través de la interacción directa con su 3'UTR.....	68
1.5.- La sobreexpresión del mir-146b reduce la activación del promotor de NIS y reprime la expresión de FOXE1 de manera independiente de su 3'UTR.....	70
1.6.- La expresión del miR-146b-3p es inhibida por TSH y recuperada por IGF1 y TGFβ.....	72
<b>2.- Función de los microRNAs en la proliferación, supervivencia y motilidad de la célula tiroidea.....</b>	<b>73</b>
2.1.- Caracterización computacional del <i>dianoma</i> o conjunto de dianas de los miRs en la vía PI3K en la célula tiroidea.....	73
2.2. Influencia del miR-146b en la progresión tumoral a través de la modulación de la vía PI3K en la célula tiroidea .....	74
2.2.1.- PTEN es regulado directamente por el miR-146b-5p y sus niveles de expresión correlacionan inversamente en la célula folicular tiroidea .....	74
2.2.2.- La sobreexpresión del miR-146b promueve la exclusión nuclear de FOXO1.....	76
2.2.3.- La sobreexpresión del mir-146b induce la exclusión nuclear de p27 y reduce sus niveles totales.....	77
2.2.4.- El miR-146b induce proliferación desencadenando la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular. ....	79
2.2.5.- El miR-146b aumenta la supervivencia mediante la sobreexpresión de BCL-2 en la célula folicular tiroidea .....	80
2.3.- Función del eje LIN28B/miR-30a en la progresión tumoral a través de la modulación de la vía PI3K en la célula tiroidea. ....	81
2.3.1.- La expresión de LIN28B es reprimida durante diferenciación inducida por TSH en la célula folicular tiroidea.....	82
2.3.2.- La proteína oncofetal LIN28B presenta una expresión aberrante en los carcinomas tiroideos con hiperactivación de la vía PI3K.....	83

2.3.3.- Mir-30a desestabiliza el mRNA de LIN28B uniéndose de manera directa a su 3'UTR inhibiendo su expresión proteica.....	84
2.3.4.- Mir-30a y LIN28B se reprimen recíprocamente conformando un circuito de retroalimentación negativa bidireccional.....	86
2.3.5.- El eje LIN28B/mir-30a regula la activación de la vía PI3K en cáncer de tiroides..	87
2.3.6.- La supresión del mir-30a exagera procesos oncogénicos ya iniciados en el CPT contribuyendo al proceso de dediferenciación resultante en el CAT.....	89
2.3.7- Mir-30a reprime la expresión importantes marcadores de TEM .....	91
2.3.8- El eje LIN28B/miR-30a controla la invasión y la proliferación en la célula folicular tiroidea .....	93
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>95</b>
<b>1.- El circuito regulatorio miR-146b-3p/PAX8/NIS regula la diferenciación y la captación de yodo en el carcinoma tiroideo .....</b>	<b>97</b>
<b>2.- El microRNA-146b media el silenciamiento de PTEN y promueve la hiperactivación de la vía PI3K/AKT provocando la progresión del carcinoma tiroideo.....</b>	<b>102</b>
<b>3.- El eje LIN28B/mir-30a controla la invasión y la proliferación en la célula folicular tiroidea .....</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>137</b>

## Abreviaturas





## Abreviaturas

### A

- AC: Adenilato ciclasa
- AKT/PKB: proteína quinasa B
- AGO2/Argonauta 2: proteína catalítica del complejo RISC

### B

- BAD: Antagonista de BCL-2/Bcl-XL, que provoca muerte celular
- BCL-2: Proteína de células de linfoma B tipo 2
- BCL-XL: Proteína extragrande de células de linfoma B
- BRAF: Homólogo B1 del oncogén v-raf del virus del sarcoma murino.

### C

- cAMP: AMP cíclico
- CAT: carcinoma anaplásico de tiroides
- CDH1: E-Cadherina
- CDK: Kinasa dependiente de ciclina
- CFT: carcinoma folicular de tiroides
- Ciclina D1 y D3: ciclinas específicas de la fase G1/S del ciclo celular
- Ciclina E: ciclinas específicas de la fase G1/S del ciclo celular
- CPDT: carcinoma pobremente diferenciado de tiroides
- CPT: carcinoma papilar de tiroides
- CREB: Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP

### D

- DICER: endorribonucleasa miembro de la familia de las RNAsas III.
- DGCR8: Di Giorgio Critical Region 8. Proteína de unión al RNA. Componente del Microprocesador
- DROSHA: Ribonucleasa III de clase 2. Componente catalítico del microprocesador
- DUOX1/2: Oxidasa dual uno y dos

### E

- E2F: Factor de Elongación 2

- ERK: Kinasa regulada extracelularmente

## F

- FN1: Fibronectina 1
- FOXE1: factor de transcripción “Forkhead box E1”, también conocido como TITF2 de factor de transcripción tiroideo 2
- FOXO1: factor de transcripción “Forkhead box O” 1
- FT: factores de transcripción
- FTT: factores de transcripción tiroideos

## G

- GSK3 $\beta$ : Glicogeno sintasa quinasa 3  $\beta$

## H

- HHex: factor de transcripción “Hematopoietically Expressed Homeobox”
- Hormona tiroidea T3: Triyodotironina
- Hormona tiroidea T4: Tiroxina

## I

- IGF1: Factor de crecimiento similar a insulina 1
- IRS-1: Sustrato del receptor de insulina
- IYD/DEHAL: Yodotirosina desyodinasas

## M

- MAPK: Proteína kinasa activada por mitógenos
- miRNA: microRNA
- miR: producto/hebra madura de un miRNA. Puede acompañarse del sufijo “-3p” o “-5p” para determinar si es la hebra proveniente del brazo 3p o 5p del precursor
- ERM: Elemento de respuesta a miRs

## N

- NIS: Simportador de Na<sup>+</sup>/I
- NKX2-1: factor de transcripción “homeobox” también conocido como TITF1 de factor de transcripción tiroideo 1
- NUE: “*NIS upstream enhancer*” o potenciador corriente arriba de NIS

## P

- p27KIP: Proteína inhibidora de CDK
- p53: Gen supresor tumoral que se activa en respuesta al daño al DNA
- PAX8: factor de transcripción “Paired box8”
- PDK1: quinasa dependiente de 3'-fosfoinositidos-1
- PI3K: Fosfatidil-inositol 3'-quinasa
- PI3KCA: subunidad catalítica  $\alpha$  de la PI3K
- PIP2: Fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato
- PIP3: Fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato
- PKA: Proteína quinasa dependiente de cAMP
- PKC: Proteína quinasa C
- PTEN: Homólogo de la fosfatasa y la tensina deletado en el cromosoma 10. (*Phosphatase Tensin homolog deleted on chromosome 10*).
- Pre-mir: precursor inmaduro de ambas hembras de un miR en forma de horquilla. Es generado a partir de un pri-mir por el microprocesador
- Pri-mir: Transcrito primario compuesto por 1-7 precursores de miR.

## R

- RAS: pequeña GTPasa implicada en proliferación. Originalmente “*Rat Sarcoma viral oncogene homolog*” (Homólogo de un oncogén viral de sarcoma de rata)
- RB: Proteína Retinoblastoma
- RISC: Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (*RNA induced silencing complex*)
- RLC: Complejo de carga al RISC (*RISC-loading complex*)

## S

- SnoRNA 142: RNA pequeño nucleolar 142. También llamado RNA pequeño nucleolar C/D box 66 (SNORD66)
- S6K p90: Quinasa ribosomal S6

## T

- T3: Triyodotironina
- T4: Tiroxina
- TG: Tioglobulina
- TEM: transición epitelio-mesenquima

- TGF $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta
- TME: transición mesenquimo-epitelial
- TP53: Gen que codifica la proteína p53
- TPO: Tioperoxidasa
- TRAF6: factor 6 del receptor asociado a TNF
- TRBP: Proteína de unión a RNA TAR (*TAR RNA binding protein*). Subunidad del RLC.
- TRH: Hormona liberadora de tiotropina
- TSH: Hormona estimulante del tiroides, hormona tirotrópica o tiotropina.
- TSHR: Receptor de la hormona estimulante del tiroides

## V

- VIM: Vimentina

## X

- XPO5: Exportina 5.

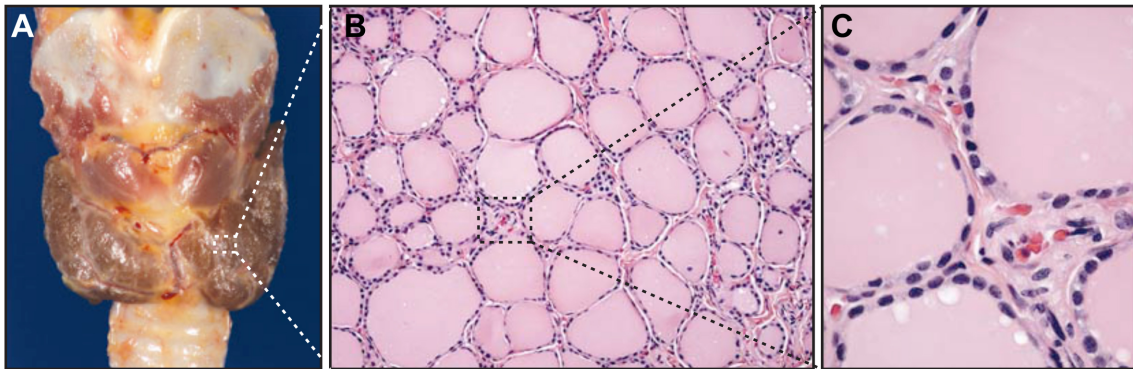
## Introducción



## 1.- La glándula tiroidea

La glándula tiroidea se localiza en el cuello a la altura del cartílago cricoides y está formada por dos lóbulos que se sitúan a ambos lados de la tráquea y se unen anteriormente por un istmo (Fig. 1A). Está constituida fundamentalmente por dos tipos celulares: las células foliculares o tirocitos, la población celular mayoritaria, responsable de la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (HT); y las células parafoliculares o células C, dispuestas de forma aislada y responsables de la secreción de calcitonina. Durante muchos años se aceptó que las células foliculares eran de origen endodérmico y las células C procedían de la cresta neural. Actualmente, aunque sigue siendo un tema controvertido en el campo, se acepta que ambas estirpes celulares parecen provenir de la hoja embrionaria endodérmica (Kameda, 2007).

Las células foliculares son células epiteliales polarizadas, con una membrana basal en contacto con el torrente sanguíneo y una membrana apical que deja en el centro un lumen relleno de una sustancia coloidal formada fundamentalmente por tiroglobulina (TG) -la molécula precursora de las HT-.



**Fig. 1.- Panel A: Localización y morfología de la glándula tiroidea:** La glándula tiroidea está formada por dos lóbulos unidos por un istmo y se sitúa en la parte anterior de la tráquea. **Panel B y C: Arquitectura de los folículos tiroideos:** Fotografía de un corte de tejido tiroideo humano normal teñido con hematoxilina-eosina, observado al microscopio óptico con distintos aumentos. Figura modificada de Nikiforov, 2001.

Además, las células están interconectadas entre sí en la región basolateral de la membrana por: i) uniones adherentes localizadas en la parte más cercana a la región basal de la membrana basolateral de la célula polarizada; y ii) por uniones estrechas, localizadas en la parte más cercana a la región apical de dicha membrana.

A estas estructuras se las denomina folículos y constituyen las unidades funcionales de la glándula tiroidea, capaces de sintetizar, acumular y secretar las HT tiroxina ( $T_4$ ) y triyodotironina ( $T_3$ ) (Fig. 1B y C). Las HT, tras interacción con sus receptores, desempeñan un papel clave en la regulación de la proliferación, diferenciación, desarrollo y crecimiento de muchos tejidos y tipos celulares; así

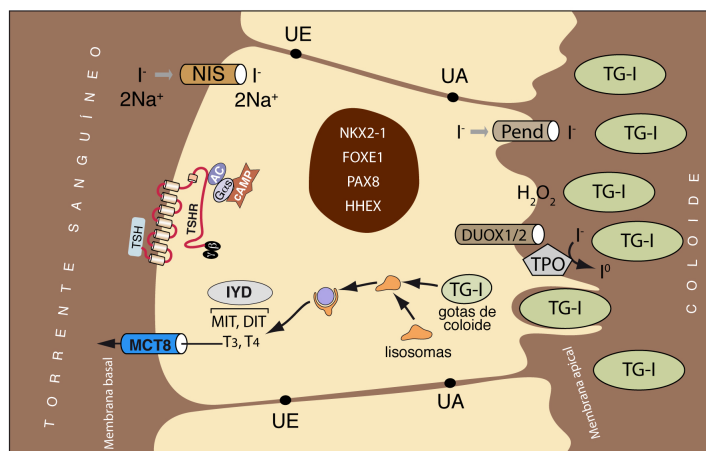
como en la formación y progresión de varias patologías, entre ellas el cáncer (Aranda, 2001; Pascual, 2013).

### 1.1.- Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas

El yodo es el componente principal de las HT, por ello la célula folicular acumula este oligoelemento activamente debido a la expresión en la membrana basolateral del tirocito de la proteína transportadora de yodo. Esta proteína denominada NIS ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporter) es la responsable del transporte activo del yodo desde el torrente sanguíneo al interior de las células foliculares (Dai, 1996). Es una glicoproteína con 13 dominios transmembrana, localizada basolateralmente en las células foliculares, que transporta 2 cationes de sodio ( $\text{Na}^+$ ) por cada anión de yoduro ( $\text{I}^-$ ).

El yodo captado por NIS al interior celular es transportado hacia la membrana apical y de allí transportado al lumen coloidal a través de otros transportadores de membrana como la pendrina (Yoshida, 2004) en un proceso aún no del todo elucidado. En el lumen tiene lugar el proceso de organificación del yodo que comienza con su oxidación a  $\text{I}^+$ , mediada por la enzima Tiroperoxidasa (TPO) que utiliza como sustrato el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido por las oxidasas duales DUOX1/2 (De Deken, 2002). A continuación, el  $\text{I}^+$  es incorporado a los residuos aminoacídicos de tirosina de la TG, acumulándose en el coloide, del que es componente principal (Degroot, 1977). El proceso de biosíntesis de HT continúa con la pinocitosis de la TG coloidal (Bernier-Valentin, 1991), que es hidrolizada en la célula folicular por enzimas lisosomales, produciendo las HT ( $\text{T}_3$  y  $\text{T}_4$ ) que se secretan al torrente sanguíneo a través de una proteína transportadora denominada MCT8. (Fig. 2).

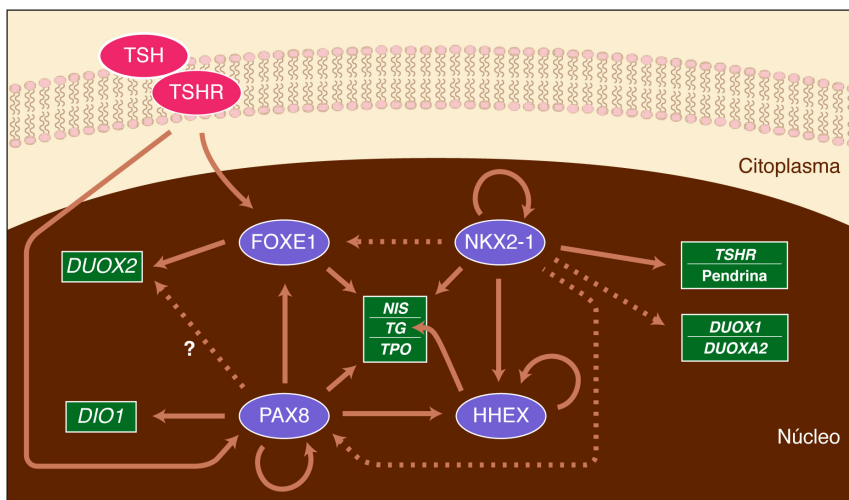
La hormona estimulante de la tiroides (TSH) o Tirotropina es la hormona que regula la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas.



**Fig. 2.- Biosíntesis y secreción de las hormonas tiroideas** en una célula folicular tiroidea. NIS: Simportador de  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ , DUOX: Oxidasa dual, TPO: Tiroperoxidasa, TG: Tiroglobulina,  $\text{T}_3$ : Triyodotironina,  $\text{T}_4$ : Tiroxina, TSH: Tirotropina, TSHR: Receptor de tirotropina, AM: Uniones adherentes, TJ: Uniones estrechas.



Los genes de diferenciación tiroidea NIS, TG, TPO y el receptor de TSH (TSHR) sólo se expresan de manera conjunta en la glándula tiroidea y son esenciales para su correcta función. Su expresión está condicionada a la presencia de TSH a través de los factores de transcripción, PAX8, NKX2-1, HHEX y FOXE1 (Fig. 3).



**Fig. 3.- Factores de transcripción tiroideos (FTT).** El proceso de diferenciación tiroidea está regulado por la TSH, a través de la unión a su receptor de membrana, TSHR. Los 4 FTT, NKX2-1, HHEX, FOXE1 y PAX8 se regulan mutuamente y determinan la expresión de los genes de diferenciación tiroideos NIS, TG, TPO, TSHR, Pendrina, DIO1 y la familia de las oxidasas duales (DUOX). Flechas sólidas indican unión directa de los FT a sus dianas. Flechas punteadas indican una regulación indirecta. Los FTT se muestran en azul y sus genes diana en verde.

## 1.2.- Señales extracelulares implicadas en el control de la célula tiroidea

### 1.2.1.- La tirotropina (TSH)

La tirotropina o TSH (Thyroid Stimulating Hormone) es el principal regulador de la función tiroidea. Estimula la proliferación e hipertrofia de las células foliculares y desencadena la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas tras su interacción con su receptor de membrana (TSHR) (Vassart, 1992). En ratones, la ausencia de TSH o de su receptor permite un desarrollo tiroideo normal hasta el momento del nacimiento. A partir de ese momento, la tiroides se atrofia y la expresión de TPO y NIS se reduce drásticamente (Postiglione, 2002).

El TSHR es un receptor acoplado a proteínas G que se localiza en la membrana basal de la célula folicular tiroidea. La unión de TSH desencadena la liberación de la subunidad G $\alpha$ s, la cual promueve la activación de la Adenilato Ciclasa (AC) con el consiguiente aumento de los niveles intracelulares de cAMP (Calebiro, 2009). El cAMP es el principal mediador de la señal inducida por TSH y su aumento desencadena la proliferación y la diferenciación (Roger, 1984 y 1997; Dere, 1986; Kimura, 2001; Ledent, 1992).

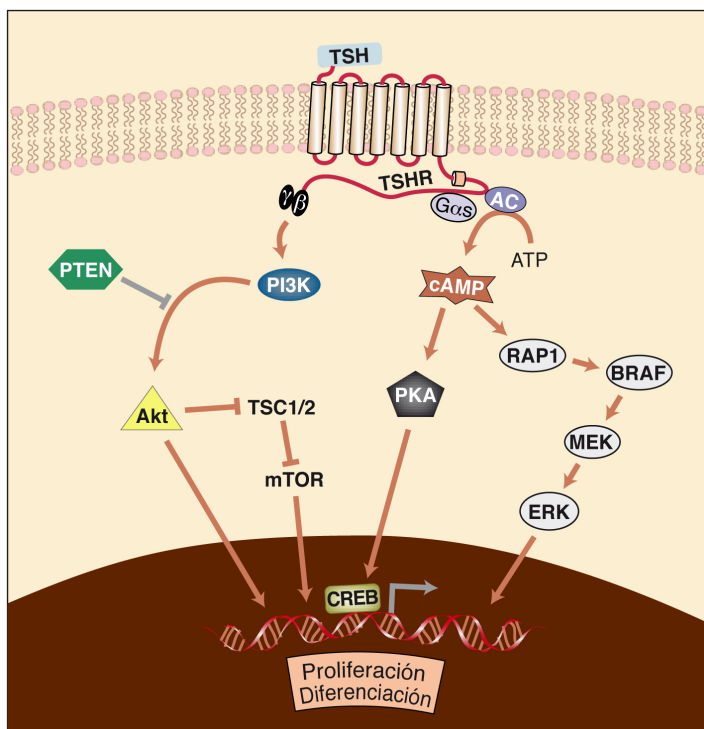
El aumento en los niveles de cAMP desencadena la activación de la quinasa dependiente de cAMP (PKA) (Kupperman, 1993; Cass, 1999). La PKA es un tetrámero formado por dos subunidades

catalíticas y dos reguladoras. La unión de dos moléculas de cAMP a cada subunidad reguladora, desencadena la liberación de las subunidades catalíticas y su difusión pasiva al núcleo donde fosforilan diversos factores de transcripción. Uno de los factores de transcripción fosforilados por la PKA más importantes es la proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB). La fosforilación de CREB por parte de PKA en el residuo aminoacídico ser133 favorece su unión al DNA y el reclutamiento de CBP y p300, lo que aumenta su actividad transcripcional (Chrivia, 1993; Kwok, 1994). Según se ha demostrado en el modelo murino, la expresión del factor de transcripción CREB es crucial para el mantenimiento de la función tiroidea (Nguyen, 2000).

En definitiva, está ampliamente demostrado que la activación de la vía cAMP-PKA-CREB por parte de la TSH desempeña un papel fundamental en la proliferación y la diferenciación de la célula folicular tiroidea.

### 1.2.2.- Vías de señalización alternativas activadas por TSH

La TSH induce no sólo la vía cAMP-PKA-CREB, sino que también activa otras vías relacionadas con la diferenciación y proliferación en la célula folicular tiroidea como la fosfolipasa C, las GTPasas RhoA y Rab1, las quinasas mTOR1, PI3K, PKC y ERK (Devlin, 2000; Medina, 2000; Kim, 2002; Brewer, 2007; Cass, 1999; De Gregorio, 2007; Park, 2002; Nellore, 2009).



**Fig. 4.- Vías de señalización activadas por TSH.** Tras la activación del receptor de TSH se activa principalmente la subunidad Gas, activando a la enzima adenilato ciclasa (AC) que promueve la generación del segundo mensajero cAMP a partir de ATP. El cAMP puede activar diversas vías de señalización, actuando sobre la PKA que transmite su señal a través del factor de transcripción CREB. Así mismo, el cAMP puede activar la cascada de las MAPK a través de la activación de la GTPasa RAP1. Por otra parte, la liberación de los dímeros βγ activará la PI3K y a su efector AKT. Las flechas indican activación y las líneas truncadas inhibición.

Además de la transducción de la señal mediada por la liberación de la subunidad Gas, antes mencionada, la liberación de los dímeros  $\beta\gamma$  induce una activación -cAMP independiente- de la PI3K, que contribuye a la proliferación de los tirocitos y tiene un efecto dual sobre la diferenciación que explicaremos más adelante (Zaballos, 2008) (Fig. 4).

### **1.2.3.- El factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1)**

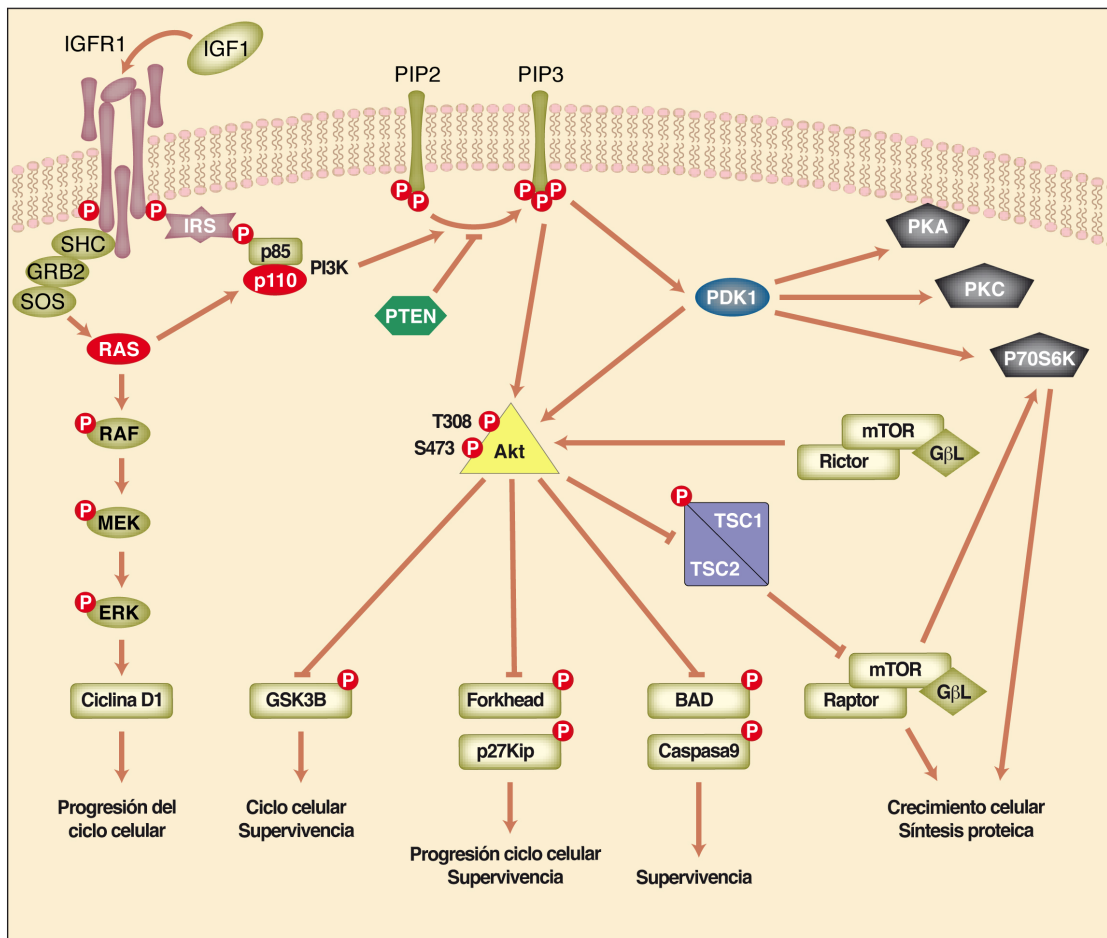
Junto con la TSH, la acción del factor de crecimiento IGF1 o de la insulina es necesaria para la correcta proliferación de la célula folicular tiroidea. Estudios realizados en el modelo murino demuestran que la inactivación del receptor de IGF1 resulta en una necesidad compensatoria de mayores niveles de TSH para mantener el tamaño y la función tiroidea (Muller, 2011); y que la sobreexpresión de IGF1 o de su receptor estimulan la proliferación de los tirocitos (Clement, 2001). En cambio, la delección -circunscrita a la glándula tiroides- del receptor de la insulina no produjo alteraciones funcionales (Ock, 2011).

El receptor de IGF1 (IGF1R) es una proteína transmembrana con actividad tirosina quinasa. La unión de IGF1 desencadena la dimerización del receptor y su autofosforilación en residuos tirosina y serina, que promoverán la unión de proteínas adaptadoras como Sustrato del Receptor de Insulina 1 y 2 (IRS1 y 2) o SHC (Ariga, 2000) que a su vez activarán diferentes rutas de señalización. Por una parte, SHC interacciona con las proteínas GRB2 y SOS desencadenando la activación de la GTPasa RAS que inicia así la ruta de las MAPK aumentando la proliferación celular. Por otro lado, la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) es activada a través de su interacción con la proteína adaptadora IRS1 o aumentando su actividad a través de su interacción con GTPasas como RAS. Esta segunda vía -de activación de la PI3K a través de IRS1- está descrita como la mediadora de la mayoría de los efectos desencadenados por la acción de IGF1 (Saito, 2001). La activación de la PI3K origina la fosforilación de residuos fosfatidil inositol (4, 5) difosfato (PIP2) ligados a la membrana plasmática que pasan a fosfatidil inositol (3, 4, 5) trifosfato (PIP3).

De manera inversa, el gen supresor tumoral PTEN (fosfatasa y homólogo de tensina deletado del cromosoma 10) defosforila PIP3 a PIP2 siendo el principal modulador negativo de la actividad de la vía PI3K.

El PIP3, incorpora a la membrana plasmática a proteínas con dominios PH (homólogo a pleckstrina), entre las que están la proteína quinasa B (PKB/AKT) y la quinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK1). El reclutamiento de PDK1 a la membrana promueve la fosforilación de AKT en el residuo de treonina 308 (Chan, 1999). Esta fosforilación activadora viene precedida y promovida por otra llevada a cabo por el complejo mTOR2/Rictor en la Serina 473 (Sarbasov, 2005).

Se ha demostrado que la forma activada de AKT es capaz de fosforilar diversas proteínas. Esta señalización tiene, en general, una función antiapoptótica y proliferativa. El promotor de mortalidad asociado a BCL-2 (BAD) y la caspasa-9 son dos proteínas proapoptóticas cuya fosforilación resulta en la inactivación de su función.



**Fig. 5.- Vías de señalización activadas por IGF1.** Tras la unión de IGF1 a su receptor se produce el reclutamiento de IRS-1 que promueve la activación de la enzima PI3K. Esta enzima fosforila a PIP2 (Fosfoinositol bisfosfato) para generar el segundo mensajero PIP3 (Fosfoinositol trifosfato). La reacción opuesta es llevada a cabo por la proteína fosfatasa PTEN. PIP3 atrae a AKT y a la enzima PDK1 a la membrana, que junto con mTOR promueve la activación de AKT fosforilada a una amplia variedad de sustratos. Además, AKT activará mTOR estableciendo un bucle de activación positivo. El receptor de IGF1 también reclutará otras proteínas como SHC, que a su vez llevará a la activación de RAS mediante el reclutamiento de GRB2 y SOS. Esto iniciará la cascada de las MAPK, MEK/ERK. Las flechas indican activación y las líneas truncadas inhibición.

De igual manera, la fosforilación de los factores de transcripción FOXO y del inhibidor de quinasas dependiente de ciclina p27KIP resulta en su exclusión nuclear con la consiguiente pérdida de su función moduladora de la proliferación (Brunet, 1999; Shin, 2002; Zaballos, 2013; Liang, 2002). Por último, también está demostrada la fosforilación inhibitoria sobre la quinasas de la glucógeno sintasa 3 (GSK3) (Cross, 1995); así como la fosforilación activadora sobre mTOR que induce un aumento en la biosíntesis proteica (Scott, 1998; Hay, 2004) (Fig. 5).

### **1.3.- Regulación de la proliferación en la célula folicular tiroidea**

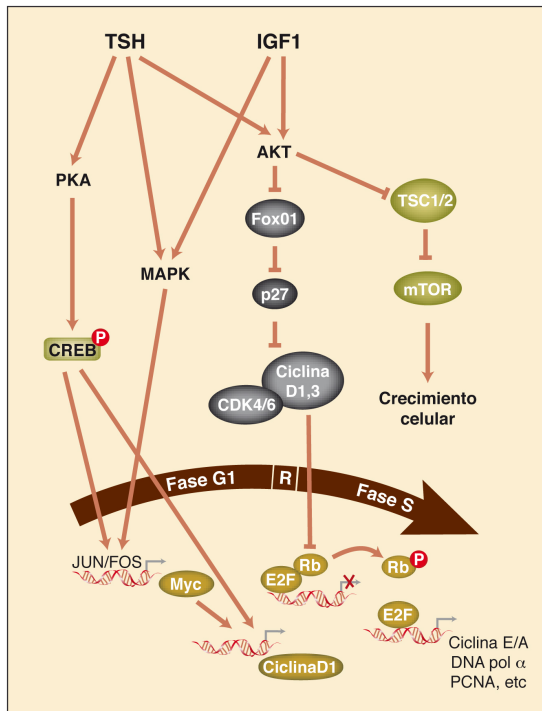
#### **1.3.1.- Estímulos proliferativos: TSH e IGF1**

Aunque durante la embriogénesis la glándula tiroidea atraviesa fases de alta tasa proliferativa (Trueba, 2005; Fagman, 2006), este fenómeno va mitigándose progresivamente hasta alcanzar, durante la vida adulta, una proporción de células foliculares en división por debajo de 2%. La señalización hormonal llevada a cabo por la TSH sinergiza con la llevada a cabo por el factor de crecimiento IGF1 fomentando la proliferación a través de la inducción de la entrada en G1 y la transición G1-S (Tramontano, 1986; Brenner-Gati, 1988; Burikhanov, 1996; Kimura, 1999).

La unión de TSH a su receptor provoca la activación de las vías PKA/CREB y posteriormente mediante los efectores finales JUN/FOS y C-MYC, mTOR/Raptor y la PLD/PKC induce la síntesis de DNA (Woloshin, 1992; Kimura, 1999; Cass, 1999; Fujimoto, 1992; Kim, 2002). De manera complementaria, IGF1 induce la transición a la fase S activando la cascada PI3K/AKT (Saito, 2001) y otras quinasas como las MAPK (Burikhanov, 1996) o mTOR/Raptor (Blancquaert, 2010).

Pero es la acción combinada y sinérgica de ambos ligandos, TSH e IGF1, la que desencadena el efecto proliferativo. Aunque los mecanismos subyacentes a este fenómeno no han sido elucidados completamente, se especula que es el resultado de la activación de rutas comunes como mTOR/Raptor -que se activa en respuesta a ambos ligandos (Blancquaert, 2010)-, MAP quinasas o PI3K/AKT. Sin embargo el grado de participación relativa de IGF1 y TSH en estas dos últimas vías no está todavía bien delimitado (Ariga, 2000; Vandeput, 2003; Brewer, 2007; De Gregorio, 2007; Zaballos, 2008; Vuchak, 2009).

La inducción de la expresión de los efectores finales c-FOS y c-MYC por parte de la vía de las MAP quinasas y de pCREB, desencadena la expresión de las ciclinas de fase G1 temprana D1 y 3, y de las CDKs 2,4 y 6 (Van Keymeulen, 1999; Lewis, 2004; Paternot, 2006; Fukushima, 2008). Los complejos Ciclina/CDKs provocan una fosforilación inhibitoria sobre la proteína Retinoblastoma (Rb) (Medina, 2000), que inducen su desvinculación de los factores de transcripción de la familia E2F. Estos factores E2F, una vez liberados de su nexo con la RB, estimulan la expresión de la ciclina de fase G1 tardía E y otros genes relacionado con las síntesis de DNA (Lewis, 2004). De igual manera, este mecanismo de activación transcripcional de la familia de factores E2F se ve favorecido por la translocación citoplasmática y posterior degradación del inhibidor de quinasas dependientes de ciclina p27KIP y del factor de transcripción FOXO1, también en respuesta a TSH y a IGF1 (Medina, 2000; Fukushima, 2008; Lewis, 2004; Zaballos, 2013) (Fig. 6).



**Fig. 6.- Progresión del ciclo celular en respuesta a TSH e IGF1.** La activación de la vía PKA y MAPK en respuesta a TSH e IGF1 induce la expresión de genes tempranos como c-myc y c-fos que activarán la expresión de las ciclinas D necesarias para la entrada en G1. La activación de AKT inducirá la inhibición de FOXO1 y de su gen diana p27Kip, que se encontraba inhibiendo los complejos ciclinaD/CDK4/6. Una vez activos estos últimos inhibirán a la proteína Retinoblastona (Rb) lo que permitirá la actividad de los factores de transcripción E2F, que activarán la expresión de genes necesarios para la síntesis de DNA.

## 1.4.- La diferenciación en la célula folicular tiroidea

### 1.4.1.- TSH

Como hemos mencionado anteriormente, la expresión de los factores de transcripción tiroideos comienza de manera temprana durante el desarrollo embrionario. Además, esta expresión es inducida de manera independiente de la secreción hipofisaria de TSH ya que ésta no comienza hasta las etapas finales de la gestación (Postiglione, 2002), cuando también comienza la expresión del TSHR en las células tiroideas (Lazzaro, 1991).

Aunque en la tiroides adulta, se expresan los factores de transcripción tiroideos, tanto en células privadas de TSH como carentes de su receptor (Postiglione, 2002), numerosos estudios demuestran que la TSH promueve la expresión de PAX8 y FOXE1 (Medina, 2000b; Mascia, 2002; Ortiz, 1997). Además, en presencia de un dominante negativo de CREB en la tiroides, la expresión de todos los factores tiroideos disminuye (Nguyen, 2000). Estos datos parecen sugerir que la TSH regula la expresión de -al menos- PAX8 y FOXE1 -presumiblemente a través de la ruta PKA/CREB- pero que existen mecanismos compensatorios en caso de carencia de TSH o de su receptor (De Felice, 2004).

Por otra parte, la regulación de la expresión de NKX2-1 por TSH es controvertida: diversos estudios in vitro indican que la expresión de NKX2-1 es TSH-independiente (Van Renterghem, 1995), y en cambio otros afirman que es inhibida por esta hormona (Saito, 1997; Medina, 2000). Sin embargo, la

unión de este factor de transcripción al DNA sí que es favorecido en presencia de TSH mediante modificaciones postraduccionales como por ejemplo fosforilaciones (Velasco, 1998). Un fenómeno similar -en el que la unión de un FT tiroideo al DNA se ve favorecida en presencia de TSH- se da con PAX8 mediante la inducción de cambios en el estado redox de la célula (Kambe, 1996).

En cuanto a la expresión de los genes de diferenciación tiroideos TPO, NIS, TG y TSHR, se ha demostrado el papel fundamental de la TSH en su inducción (Marians, 2002; Postiglione, 2002). Esta inducción está probablemente mediada por PAX8, FOXE1 y NKX2-1 a través de sitios de unión de estos FT presentes en los promotores de los mencionados genes de diferenciación (Ohno, 1999; Zannini, 1992; Espinoza, 2001; Civitareale, 1993). Además, el promotor de la TG presenta la singularidad de requerir la interacción física de PAX8 y NKX2-1 para su activación (Di Palma, 2003).

#### **1.4.2.- IGF1**

El factor de crecimiento similar a la insulina participa de manera secundaria en la diferenciación tiroidea. Por un lado, este factor de crecimiento ejerce una acción prodiferenciadora incrementando los niveles de FOXE1 (Ortiz, 1997), pero por otro, reduce la inducción de la expresión de NIS en respuesta a TSH a través de la activación de la vía PI3K/AKT (García, 2002).

Por esta limitada acción, está establecido que -al contrario de la TSH, que tiene un efecto dual en proliferación y diferenciación- IGF1 tiene un papel predominantemente regulador de la proliferación en las células foliculares tiroideas.

#### **1.4.3.- PAX8**

Como hemos mencionado anteriormente, PAX8 es un factor de transcripción clave en la diferenciación tiroidea. PAX8 desempeña un papel fundamental en la proliferación y supervivencia de los precursores tiroideos por sí mismo e induce la expresión de otros factores clave como FOXE1, HHEX (Puppin, 2004; D'Andrea, 2006; Di Palma, 2011) y NKX2-1 (Nitsch, 2010),

En la glándula tiroidea adulta la expresión de PAX8 es necesaria para la diferenciación tirocítica (Marotta, 2014) y experimentos in vitro han demostrado que es necesario para la expresión de NIS, TPO y TG (Ruiz-Llorente, 2012). A pesar de que los promotores de estos genes de diferenciación tiroidea albergan también -además de para PAX8- sitios de unión para NKX2-1 y de que también participan en su regulación, se ha demostrado que es PAX8 el que desempeña un papel limitante (Pasca di Magliano, 2000).

#### **1.4.4.- NIS**

Uno de los genes de diferenciación más importantes regulado por PAX8 es el simportador de sodio y yodo (NIS) (Ohno, 1999). Este transportador es una molécula clave en la fisiología tiroidea, ya que media el transporte activo de yodo en la célula folicular, resultando esencial para la biosíntesis de las HT. Además, resulta especialmente relevante en el ámbito clínico por su capacidad para captar yodo radiactivo tanto en el diagnóstico como en la terapia de las patologías tiroideas como el hipertiroidismo y el cáncer.

En la enfermedad neoplásica, la pérdida de la función -por silenciamiento o translocación citoplasmática- de NIS conlleva la refractariedad a los tratamientos con radioyodo y constituye un proceso distintivo en la tumorigénesis tiroidea.

NIS, perteneciente a la familia de transportadores de solutos SLC5A, es una glicoproteína de 643 aminoácidos, con un peso molecular de entre 70-90 kDa. En el ser humano, el transcrito posee una longitud total de 3594 nucleótidos de los cuales la secuencia codificante y el extremo 3'UTR se componen de 1929 y 1257 nucleótidos respectivamente. Sin embargo, en rata, la extensión total se reduce a 2862 nucleótidos, de los cuales 1856 son pertenecen a la región codificante y 920 al 3'UTR. Aunque la región codificante presenta una homología cercana al 90% entre ambas especies, el extremo 3'UTR de este gen es una región hipervariable que apenas presenta similitudes significativas. No obstante, un análisis superficial de los elementos de respuesta a microRNAs (ERM) -presuntos sitios de unión de microRNAs - predichos por algoritmos computacionales como MiRanda o TargetScan, revela que muchos de ellos son compartidos en ambas especies.

##### **1.4.4.1- Regulación de NIS**

En condiciones fisiológicas, además de la TSH, el principal factor que regula el transporte de yodo y por tanto, la actividad de NIS es el yodo mismo. La administración de altas dosis de yodo produce un descenso marcado y transitorio de la función tiroidea.

Por otro lado, diversas citoquinas y factores de crecimiento, como IGF1, TGF $\beta$ , el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ , interferón gamma, y las interleuquinas A,B, 6, reducen los niveles de mRNA de NIS lo que conlleva a una disminución en el transporte de yodo en la célula folicular (Ajjan, 1998; Costamagna, 2004; García, 2002; Pekari, 1998).

El promotor de NIS está compuesto por dos regiones reguladoras, una región proximal cerca del inicio de la transcripción y otra denominada NUE (NIS upstream enhancer), localizada varias kilobases corriente arriba del inicio de la transcripción (Ohno, 1999). Aunque ambas regiones



desempeñan un papel en la transcripción de NIS, se ha demostrado que la región NUE es primordial para que se efectúe la transcripción de NIS. En esta región existen dos sitios de unión para PAX8 así como un sitio de unión para secuencias CRE-like, cuya integridad es necesaria para la transcripción lo que indica una interacción funcional de factores de unión a CRE con PAX8. Aunque se ha confirmado la funcionalidad de los sitios de unión de NKX2-1 en la región NUE (Endo, 1997; Ohno, 1999) parece que este factor de transcripción desempeña un papel secundario. Datos recientes de nuestro laboratorio, han demostrado que FOXE1 también se une a la región NUE, cooperando con PAX8 en la activación transcripcional de NIS (Fernández, 2013)

#### **1.4.4.2- Vías de señalización implicadas en la regulación de NIS**

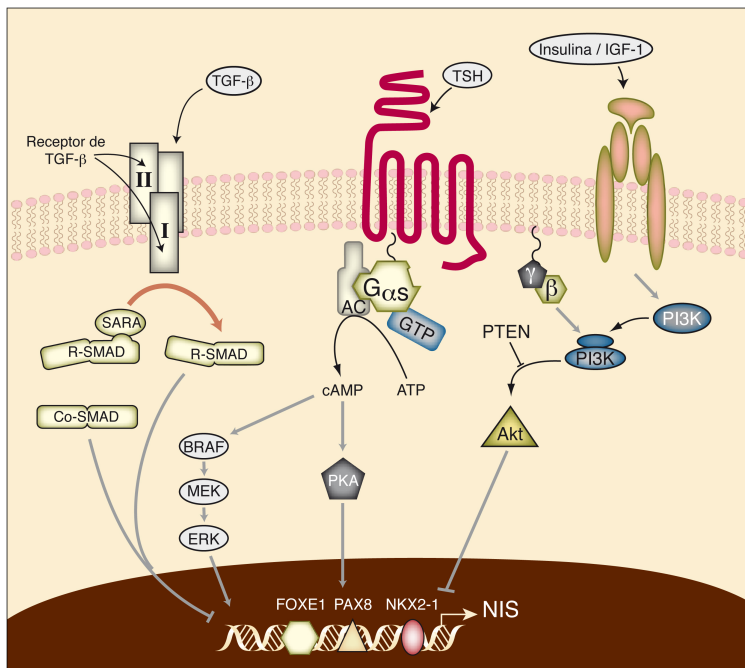
Está bien establecido que la TSH mediante la activación de la vía cAMP/PKA es la principal señal que estimula la expresión de NIS, sin embargo hay indicios de que la vía MAPK podría estar también involucrada (Taki, 2002).

Por el contrario existen dos vías de señalización que inhiben la expresión de NIS en la célula folicular tiroidea. Por un lado, IGF1, a través de la activación de la vía PI3K/AKT reprime la inducción de NIS mediada por TSH (García, 2002). Esto se interpreta como un mecanismo compensatorio para contrarrestar la potente activación de la expresión de NIS por parte de la TSH (Zaballos, 2008).

Por otro lado, la TGFβ -a través de la cascada de proteínas SMADs- es un potente represor de la expresión de NIS y de la captación de yodo (Pekari, 1998). La interacción física de las SMADs con PAX8, el principal factor de transcripción involucrado en la expresión de NIS, interfiere en la unión al DNA de este factor de transcripción, lo que origina una disminución en los niveles de mRNA de NIS (Costamagna, 2004) (Fig. 7).

#### **1.4.4.3- Regulación postranscripcional de NIS**

La captación de yodo en la célula folicular tiroidea está supeditada a la correcta localización subcelular de NIS en la membrana basolateral. Así, en ausencia de TSH, aunque los niveles proteicos de NIS se mantengan debido a una vida media de entre 3 y 5 días, al cabo de solo 24 horas la captación de yodo se reduce drásticamente debido a una translocación de NIS al citoplasma. Aunque hay indicios de que el patrón de fosforilación de NIS está regulado por la TSH, su relación con el tráfico a la membrana no ha sido del todo elucidada (Riedel, 2001).



**Fig. 7-. Vías de señalización implicadas en la regulación de NIS:** La hormona hipofisaria TSH es esencial para la transcripción de NIS. Tras la unión de TSH a su receptor se produce un aumento en los niveles de cAMP que desencadenan la activación de las vías PKA y MEK/ERK favoreciendo la transcripción de NIS. Las factores de crecimiento IGF1/Insulina y la citoquina TGFβ son señales inhibitorias de la TSH y señalizan a través de PI3K y la cascada de las proteínas SMAD, produciendo una marcada inhibición en la transcripción de NIS. Además, la propia TSH es capaz de activar vías de inhibición compensatoria de la transcripción de NIS a través de los dímeros βγ para modular los efectos de su propia activación. Modificada de Riesco-Eizaguirre, 2006.

La presencia de numerosos hipotéticos sitios de unión para microRNAs en el 3'UTR de NIS sugiere la posibilidad de la existencia de mecanismos de regulación postranscripcionales que involucren a estas especies de RNA no codificantes. El hecho -mencionado anteriormente- de que muchos de estos sitios de unión/elementos de respuesta predichos sean compartidos en ambas especies, refuerza esta posibilidad

## 2.- Cáncer de tiroides

### 2.1- Clasificación

El carcinoma tiroideo es de los más frecuentes dentro de los tumores endocrinos. Por motivos aún no del todo elucidados la incidencia de este carcinoma se ha incrementado significativamente en los últimos años.

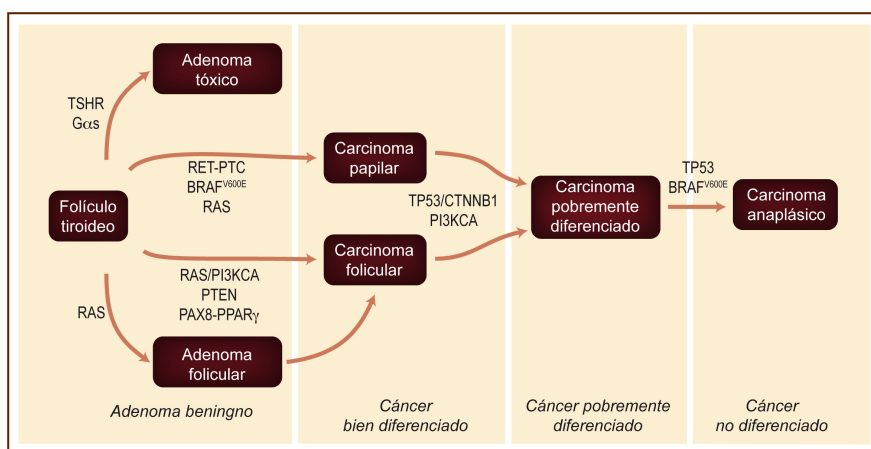
Aunque en un pequeño porcentaje de los casos (3-7%) las neoplasias tiroideas derivan de células C o parafoliculares -denominándose carcinomas medulares-, la gran mayoría derivan de células foliculares (Elisei, 2012). Estas neoplasias de origen folicular pueden ser, según su grado de diferenciación, tumores benignos y malignos (Nikiforov, 2011).

Por un lado, los adenomas tóxicos son hiperplasias benignas que producen altos niveles de HT, normalmente independientemente de los niveles de TSH. Los adenomas tóxicos constituyen entre el

2-10% de todos los casos de hipertiroidismo y prácticamente nunca progresan en malignidad. Los adenomas foliculares suponen el tumor benigno más frecuente. Son tumores diferenciados y benignos, siempre encapsulados, y que raramente evolucionan a malignidad, considerándose lesiones premalignas.

En cambio, los tumores malignos se clasifican en tumores diferenciados, pobremente diferenciados o indiferenciados. Los carcinomas diferenciados expresan TG y NIS, por lo que son capaces de captar yodo y por tanto responden al tratamiento con radioyodo. Son los más frecuentes y se clasifican en: carcinomas papilares (CPT) o carcinomas foliculares (CFT).

El CPT es la neoplasia tiroidea maligna más frecuente (80%). Presenta rasgos evidentes de diferenciación tiroidea y se caracteriza por formar papilas, tener una morfología nuclear específica y por la aparición de metástasis linfáticas locales. Existen múltiples variantes del CPT; anteriormente, las dos más frecuentes eran denominadas como variante clásica y variante folicular, siendo sustituida esta denominación en el artículo de referencia sobre el tema (TCGA, 2014) por variantes similares a BRAF y variantes similares a RAS (*BRAF-like* y *RAS-like*). La variante folicular o similar a RAS presenta un mayor grado de diferenciación y mejor pronóstico aunque es menos frecuente.



**Fig. 8-. Modelo escalonado de eventos involucrados en la carcinogénesis tiroidea.** Las células foliculares tiroideas bien diferenciadas pueden dar lugar a tumores tanto benignos como malignos. Los adenomas tóxicos son tumores benignos que están asociados con mutaciones activadoras de los genes de TSHR o Gαs. Tras sufrir mutaciones en diferentes oncogenes y genes supresores tumorales, las células foliculares tiroideas también pueden dar lugar a

carcinomas papilares o foliculares bien diferenciados, carcinomas pobremente diferenciados y carcinomas anaplásicos. Modificada de Nikiforov, 2011.

El CFT (15-20%) es una neoplasia maligna con evidentes rasgos de diferenciación tiroidea pero que no presenta las características diagnósticas del CPT. Es muy similar al adenoma folicular salvo por la presencia de invasión de la cápsula, de los vasos sanguíneos o del tejido extratiroideo. También se caracteriza por la aparición de metástasis a distancia en pulmón y hueso.

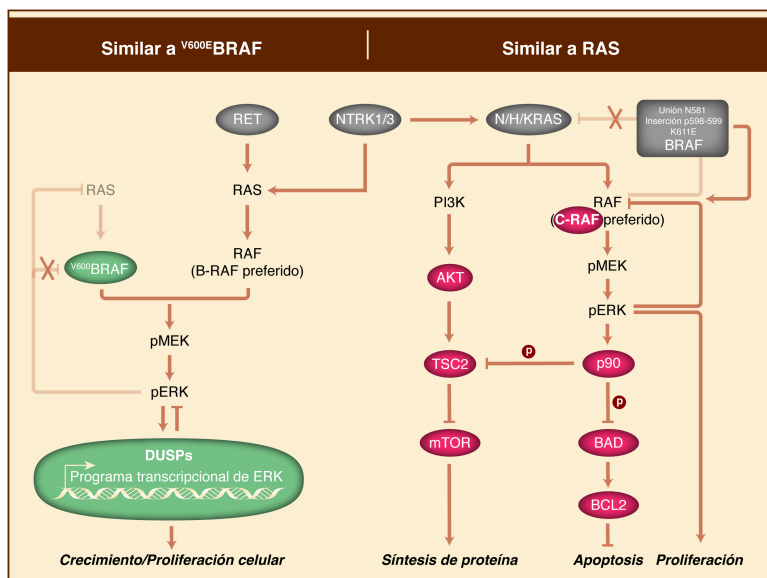
Algunos carcinomas diferenciados pierden la capacidad de captar yodo dando metástasis refractarias al yodo radiactivo, lo que empeora significativamente su pronóstico. Los carcinomas tiroideos indiferenciados, comúnmente llamados anaplásicos (CAT), son unos tumores muy infrecuentes

(<2%), altamente malignos, y sin ningún tipo de rastro de diferenciación tiroidea. Están compuestos por células atípicas que exhiben numerosas mitosis y una gran variedad de patrones. Los carcinomas anaplásicos no expresan TG ni NIS, por lo que son incapaces de captar yodo. Se caracterizan por presentar metástasis a distancia en hueso, pulmón, hígado y cerebro. La observación de focos de tejido anaplásico en el interior de CPT y CFT parece indicar que éstos son precursores del CAT. Como entidad intermedia, se ha definido como carcinomas pobremente diferenciados (CPDT) a las neoplasias que derivan de una célula folicular con atributos morfológicos intermedios entre un carcinoma bien diferenciado y uno anaplásico (Fig. 8).

## **2.2.- Alteraciones moleculares en cáncer de tiroides**

Las vías TSH-cAMP-PKA, PI3K/AKT y MAPK regulan la proliferación y diferenciación en la célula folicular tiroidea. Por ello, mutaciones en componentes de estas vías de señalización desencadenan la iniciación y progresión de los tumores tiroideos. Aunque hay algunas excepciones que divergen del modelo, está bien establecido que las mutaciones iniciadoras determinan el tipo de carcinoma tiroideo (Nikiforov, 2011). Así, mutaciones en el TSHR o en las proteínas Gas, que conlleven a una activación constitutiva de la Adenilato Ciclasa, dan lugar a adenomas tóxicos que no evolucionan a malignidad pero que conllevan altos niveles de HT. Por el contrario mutaciones activadoras de la vía de la PI3K/AKT como aquellas en las variantes H, N o K del oncogén RAS, de la PI3KCA o supresión del inhibidor PTEN, o el reordenamiento cromosómico PAX8/PPRAY conducen a la formación del adenoma folicular o del carcinoma folicular. Por otra parte, las mutaciones que comportan la activación exclusiva de la vía de las MAPK (BRAF V600E, la más frecuente, y reordenamiento cromosómico RET/PTC) suelen favorecer la aparición de formas de carcinoma papilar, concretamente del tipo "similar a BRAF" o anteriormente llamada variante clásica. Además, se ha demostrado que las bases moleculares del CPT son muy heterogéneas y también se han observado mutaciones que conllevan a una activación menor de las MAPK MEK/ERK, pero de efecto dual al comportar también una sobreactivación de la vía PI3K como mutaciones en RAS (aprox. 25%), BRAF K601E y fusiones en NTRK1/3. Esta variante, que es la anteriormente conocida como variante folicular del CPT, ahora conocida como "similar a RAS", presenta una menor activación de las MAPK, un mayor grado de diferenciación, y un menor grado de riesgo (TCGA, 2014) (Fig. 9). Tanto en el CPT como en el CFT, las mutaciones iniciadoras son excluyentes.

La aparición de mutaciones adicionales promueve la progresión hacia carcinoma pobremente diferenciado o anaplásico. Hallazgos recientes apuntan a que es necesaria la sobreactivación de la vía PI3K para promover esta transición.



**Fig. 9.- Activación diferencial de las vías MAPK y PI3K entre las variantes "Similar a BRAF" y "Similar a RAS" del CPT:** Las lesiones con mutaciones conductoras a la variante "Similar a BRAF " muestran una robusta activación de la vía MAPK, resultando en una mayor activación del programa transcripcional de ERK, en particular de la familia DUSP, , por la insensibilidad de BRAFV600E a la retroalimentación inhibitoria de ERK. Por otro lado, los tumores agrupados en la variante "Similar a RAS" exhiben menor activación de las MAPK pero mayor actividad de la vía PI3K, en forma de unos niveles de pAKT más elevados. El mecanismo de activación de las MAPK en ambas variables es distinto, con una alta fosforilación de CRAF en los tumores "Similares a RAS". Este tipo tumoral, también mostró la activación de un

programa apoptótico caracterizado por la fosforilación de BAD en la S112 y la sobreexpresión de BCL-2. Modificada de TCGA, 2014.

Así la mutación activadora de PI3KCA, la ganancia cromosómica de copias de AKT o la pérdida de función, delección o silenciamiento de PTEN, parecen eventos necesarios (García-Rostan, 2005; Santarpia, 2008; Ricarte-Filho, 2009). Los eventos finales que parecen precipitar la aparición de los CPDT y -sobretudo- de los CAT son mutaciones en el gen supresor tumoral TP53 o en el gen de  $\beta$ catenina, CTNNB1 (Fagin, 1993; García-Rostan, 1999; García-Rostan, 2001). Estas mutaciones no se encuentran nunca en carcinomas bien diferenciados (Fig. 8).

## 2.3.- Progresión tumoral y transición epitelio mesénquima

El cáncer constituye un conjunto de enfermedades caracterizadas por la pérdida de control de la proliferación y la diseminación. Para propagarse, las células epiteliales tumorales aprovechan un proceso de desarrollo reversible llamado transición epitelio mesénquima (TEM) para favorecer la migración y la invasión celular. Una vez que han alcanzado su nuevo nicho, activan un programa inverso, una transición mesénquimoepitelial (TME) para formar macro metástasis (De Craene, 2013; Nieto, 2013). Estados intermedios entre el fenotipo epitelial y el mesenquimal parecen existir durante la cascada metastática (Nieto, 2012), demostrando que las células epiteliales están dotadas de un alto grado de plasticidad que necesita ser regulada dinámicamente y finamente ajustado durante la

progresión tumoral y la metástasis (Nieto, 2013). Las células epiteliales están conectadas entre sí a través de estructuras especiales en la membrana: uniones estrechas, desmosoma y uniones adherentes que constriñen los movimientos celulares y la desconexión de la capa epitelial. La inmensa mayoría de los tumores humanos son carcinomas, que se originan de epitelio diferenciado y son susceptibles de sufrir un proceso de TEM en respuesta a señales externas (Tam, 2013, Polyak, 2009). Los eventos más importantes del programa TEM son la pérdida de la E-cadherina y de la polaridad basoapical, acompañada de la ganancia de características mesenquimales, incluyendo la adquisición de la capacidad de invasión y migración, así como una expresión aumentada de marcadores mesenquimales tales como la Vimentina, la fibronectina y la N-Cadherina.

Los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la TEM son complejos y pueden ser iniciados por multitud de señales extracelulares que finalmente activan factores de transcripción, microRNAs y/o diferentes rutas de señalización según el contexto fisiopatológico. El proceso inverso de transición mesénquimoepitelial podría ser, por lo tanto, promovido por el bloqueo de la acción de los factores y la rutas de señalización que activan la TEM (Ocaña, 2012; Tsai, 2012).

Diversas evidencias apuntan a que por lo menos 3 niveles regulatorios adicionales promueven los programas TEM y TME en paralelo: expresión de microRNAs, splicing alternativo, y control traduccional y postraduccional que afecta la localización y estabilidad proteicas (de Craene, 2013; Thiery, 2009).

De manera relevante, durante los últimos años, la implicación de multitud de microRNAs (miRs) en la regulación de FT-TEM o rutas de señalización relacionadas con el TEM han sido observadas en varios tipos tumorales humanos (Díaz-López, 2014; Kumarswamy, 2012) incluido el carcinoma tiroideo (Braun, 2010). Curiosamente, los carcinomas más pobremente diferenciados presentan una reducción global de la expresión de miRs, sugiriendo un papel relevante de estas moléculas en la regulación de los distintos mecanismos que gobiernan la plasticidad epitelial (Lu, 2005). Los mecanismos más comunes usados por los miRs para regular la plasticidad epitelial y promover o inhibir la progresión tumoral metastática son: (i) haciendo diana en los factores de transcripción que modulan la TEM o (ii) en los propios marcadores TEM, que son proteínas clave implicadas en la invasión y la migración, o enzimas regulatorias involucradas en la biosíntesis de micro RNA (Díaz-López, 2014).

### 3. MicroRNAs

Un microRNA (miRNA o miR) es un RNA monocatenario no codificante, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, que tiene la capacidad de regular la expresión proteica de otros genes mediante diversos procesos, utilizando para ello la ruta de ribointerferencia.

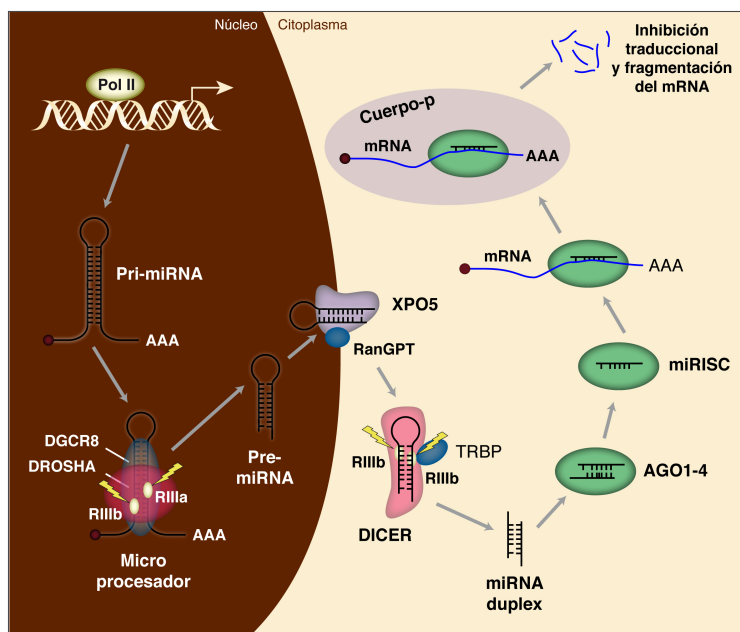
Debido a sus singulares propiedades biológicas y funcionales, los miRs son una potente herramienta diagnóstica y terapéutica. Una de sus principales características es la gran especificidad de su perfil de expresión, propio de cada tipo celular y estado fisiológico. Así, constituyen una "huella" o "firma" que permite identificar cada tejido y cada patología. Otra característica notable es su reducido tamaño, lo que le otorga una gran resistencia a la escisión endonucleolítica. Esta propiedad resulta muy ventajosa en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas.

#### 3.1.- Función y mecanismos de acción

La función de los miRs es la regulación de la expresión génica a través de la supresión de la traducción de genes específicos. Los microRNAs, pequeñas moléculas de RNA, forman parte del denominado Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (**RISC** por su acrónimo inglés “*RNA Induced Silencing Complex*”) para llevar a cabo su función. El RISC es un complejo riboproteico que, además de por el miR, está formado por proteínas de la familia argonauta (AGO), generalmente por AGO2. Para cargar la hebra del miR en el RISC, se genera de manera transitoria otro complejo llamado **RLC** (*RISC-loading complex*) o Complejo de Carga del RISC que permite el acoplamiento de los fragmentos dúplex en AGO2 para su posterior deshibridación. El complejo RLC se compone de: i) La endonucleasa Dicer1, una RNasa III que genera los dúplex de miRNAs a partir del precursor; ii) La proteína de unión a RNA TRBP; y iii) La RNasa AGO2, que constituye el centro catalítico del RISC. Posteriormente, la hebra madura del miR actúa de molde para que el complejo RISC reconozca su transcrito de mRNA complementario diana. Una vez se ha dado este reconocimiento, AGO2 se activa y fragmenta o impide la traducción del mRNA diana en un proceso conocido como ribointerferencia (Fig. 10). La hebra guía o molde (miR maduro) contenida en el RISC consigue un alto grado de especificidad a través de su hibridación con determinadas regiones de transcritos codificantes. Esta hibridación se da mediante la complementariedad de bases nitrogenadas de Watson-Crick entre -al menos- la llamada región seminal, comprendida entre las posiciones 2 y 8 del miR, y la secuencia diana en el mRNA codificante.

Los miRNAs animales suelen mostrar complementariedad imperfecta con su diana, y generalmente inhiben la traducción del mRNA, mientras que los de plantas suelen mostrar complementariedad perfecta e inducen el corte y la posterior degradación del mRNA diana.

En metazoos, la secuencia diana del transcrito suele estar localizada normalmente en su extremo 3'UTR (región no traducida del 3'), sin embargo, numerosas interacciones han sido descritas en la región codificante del mRNA e incluso en su extremo 5'UTR (Helwak, 2013). Inversamente, los miRs vegetales ejercen su acción predominantemente a través de la unión a la región codificante del transcrito diana.



**Fig. 10.- Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs.** La DNA polimerasa II transcribe el miR primario (pri-mir conteniendo hasta 7 precursores) que será fragmentado por el Microprocesador (compuesto por la endonucleasa DROSHA y la proteína de unión al RNA DGCR8) para dar una característica estructura en forma de horquilla conocida como precursor o pre-mir. El pre-mir es traslocado al citosol por la Exportina5, donde será procesado por la RNasa Dicer en colaboración con la proteína de unión al RNA TRBP para ser cargado en proteínas de la familia AGO. Este complejo miR:AGO, denominado RISC, encuentra de manera específica sus mRNAs diana induciendo su fragmentación y/o su inhibición traduccional.

Se estima que, en conjunto, los miRs regulan la expresión de al menos la mitad de los transcritos codificantes de proteínas (Krol, 2010). El hecho de que un miR regule miles de transcritos y que un transcrito dado sea regulado a su vez por cientos de miRs (Wang, 2010) produce un potente efecto biológico sobre el fenotipo celular.

La gran especificidad en la expresión de los miRs representa un nivel adicional de mecanismos de modulación fina de la expresión génica que contribuyen al desarrollo y diferenciación de la célula. Así, varios estudios han demostrado que los miRs juegan un papel fundamental en procesos como la proliferación, apoptosis y diferenciación (Esquela-Kerscher, 2006; Wang, 2010).

### 3.2.- Biogénesis

Los miRs están localizados por todo el genoma, dispuestos individualmente o en clúster o, muy frecuentemente, formando parte de intrones de genes codificantes.



Se expresan en forma de largos transcritos primarios (pri-miRNAs) conteniendo hasta 6 precursores que serán escindidos individualmente por el complejo enzimático nuclear DROSHA/DGCR8. Estos precursores individualizados (pre-miRs), de alrededor de 60 nucleótidos de longitud y estructura en horquilla, serán translocados al citoplasma mediante el transportador de membrana nuclear Exportina-5 (XPO5).

Una vez en el citoplasma, se produce una segunda escisión, esta vez por la RNasa DICER1, que fragmenta el asa de la horquilla dejando el dúplex bicatenario -normalmente de apareamiento imperfecto- hebra3': hebra5' de aproximadamente 22 nucleótidos. Este dúplex se desnaturaliza liberando ambas hebras maduras que se cargarán en el Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC) con distinta avidez, la cual viene determinada por las características estructurales del precursor (Krol, 2004; Khovorova, 2003) (Fig. 11).

Estudios recientes demuestran que un sólo gen da lugar a numerosos isomiRs: diversas secuencias maduras de distinta longitud (Morin, 2008). Este hecho tiene una gran importancia en la función de los miRs ya que la delección o adición de nucleótidos por el extremo 5' de una hebra madura provoca un desplazamiento de la región seminal resultando en un cambio radical en el conjunto de dianas potencialmente reguladas con respecto a su contraparte canónica. La cantidad y proporción de cada isomiR es específicos de tejido y se ve alterado por estados patológicos (Swierniak, 2013)

### **3.3.- MiRNAs en cáncer de tiroides**

El papel de los miRs en los tumores tiroideos ha sido estudiado en varios trabajos con anterioridad revelando un perfil específico de expresión para cada subtipo tumoral (Braun, 2010; Pallante, 2006; Nikiforova, 2008). La mayoría de los perfiles de expresión descritos fueron determinados por medio de microarrays o paneles de qPCR lo que, aun señalando expresión diferencial de algunos miRs escogidos previamente, aporta información limitada sobre los niveles absolutos y sobre miRs no contemplados a priori como candidatos. Esta tecnología basada en microarrays o paneles de qPCR ha sido superada por las herramientas de secuenciación masiva de siguiente generación (*Next Generation Sequencing tools*). Con estas herramientas se eliminan las limitaciones anteriores, no circunscribiéndose la búsqueda a ningún conjunto predeterminado de miRs, aportando niveles absolutos y permitiendo relacionar el transcriptoma del RNA pequeño con el transcriptoma codificante. Estas herramientas permiten una caracterización mucho más fina y profunda que las realizadas con la tecnología anterior.

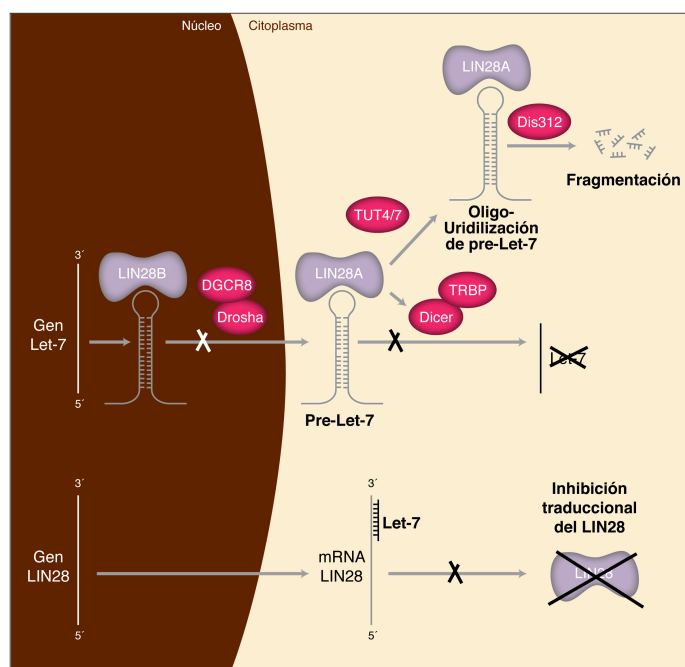
Los estudios anteriormente mencionados parecen coincidir en una sobreexpresión significativa de las familias miR-146, -181, -221/222 y -224 en el CPT; de las -181 y 200 en CFT; y de las -17 y -

221/222 en CAT, así como una marcada infraexpresión de las familias Let-7, miR-30 y miR-29 en este último tipo de carcinoma tiroideo

Esta especificidad tumoral en la expresión de miRs indica su potencial utilidad como biomarcadores tumorales. De hecho, varios trabajos han tratado de desarrollar herramientas pronóstico-diagnósticas para las neoplasias tiroideas a partir de miRs séricos o tisulares (Graham, 2015; Zhou, 2015).

#### 4.- LIN28

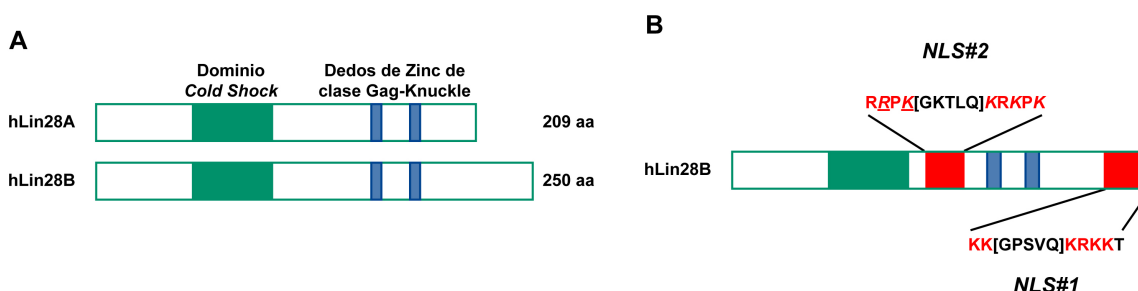
LIN28A y LIN28B son dos parálogos (secuencias homólogas separadas por un evento de duplicación, ocupando dos posiciones diferentes en el mismo genoma) de una pequeña proteína oncofetal de unión a RNA, que componen junto a Let-7 un eje de represión mutua. Así LIN28 ejerce una acción represora sobre la maduración de los miRs de la familia Let-7 y, a su vez, Let-7 inhibe postranscripcionalmente la expresión de LIN28 (Fig. 11).



**Fig. 11-. Ambos componentes del eje LIN28/Let-7 se reprime mutuamente:** LIN28B secuestra e impide el procesamiento del pri-Let-7 por parte del microprocesador -formado por DROSHA y DGCR8- en el núcleo. LIN28A secuestra e impide el procesamiento del pre-Let-7 por parte de Dicer y TRBP en el citoplasma e induce su degradación. Inversamente, los componentes de la familia Let-7 se unen al mRNA de LIN28 inhibiendo la traducción proteica de ambos parálogos.

Ambos parálogos comparten la organización de los dominios y un alto grado de homología en su secuencia (Fig. 12 panel A). Existe, sin embargo, un elemento diferencial, una pequeña extensión C-terminal en LIN28B que contiene señales de localización nuclear funcionales (*Nuclear localization signals*) KK[GPSVQ]KRKK (Fig. 12 panel B), que van a determinar la compartimentalización de cada parálogo: así LIN28B se localiza mayormente en el núcleo, mientras LIN28A lo hace predominantemente en el citoplasma. Esta distinta compartimentalización también determina el mecanismo de acción, que en el caso de LIN28A parece requerir de la TUTasa4 (Uridil transferasa

terminal 4) y la exonucleasa 3'-5' Dis312 (Chang, 2013), mientras que el mecanismo de LIN28B no requiere de ningún cofactor (Piskounova, 2011). Globalmente, LIN28 ejerce su función a través de la inhibición selectiva de los microRNAs de la familia Let-7, el incremento de la expresión de varios mRNAs -entre los que se encuentra IGF-2-, y provocando el aumento de la señalización de la vía PI3K, entre otras vías (Piskounova, 2008). Además, la sobreexpresión de LIN28 produce un aumento en la expresión de relevantes dianas de Let-7 como c-Myc, RAS y HMGA-2, y factores del ciclo celular como las Ciclinas D1 y D2 (Thornton, 2012). Así mismo, estudios previos demuestran que LIN28 tiene una acción prooncogénica, desdiferenciadora, proliferativa y glucolítica (Piskounova, 2011).



**Fig. 12.- Panel A: Distribución de dominios en LIN28:** ambos parálogos comparten la organización de los dominios y presentan una alta homología en toda la secuencia. **Panel B: Señales de Localización Nuclear funcionales** presentes en LIN28B determinan su localización nuclear.

#### 4.1.1.- Mecanismos dependientes de la inhibición de Let-7

La familia Let-7 es un factor clave en el mantenimiento del estado celular diferenciado (Bussing, 2008). Esta familia consta de 13 miembros diferentes incluyendo let-7a-1, 7a-2, 7a-3, 7b, 7c, 7d, 7e, 7f-1, 7f-2, 7g, 7i, mir-98, y mir-202. Muchos oncogenes fundamentales como RAS, MYC, las proteínas High Mobility Group-A2 (HMGA2), LIN28A y LIN28B, son reprimidos por Let-7 (Bussing, 2008). Recientemente se ha demostrado que LIN28B inhibe la maduración de Let-7 a través del secuestro del transcrito pri-Let-7 en el nucleolo, donde los componentes del complejo microprocesador DROSHA y DGCR8 -que colocalizan en el resto del nucleoplasma- están ausentes, impidiendo así el procesamiento del miRNA primario (Piskounova, 2011) (Fig. 15). La carencia de Let-7 inducida por LIN28 desreprime la expresión de las dianas oncogénicas anteriormente descritas contribuyendo a la progresión tumoral (Piskounova, 2011; Thornton, 2012; Viswanathan, 2010).

#### **4.1.2.- Mecanismos Let-7 independientes: Regulación por unión directa al mRNA**

Diversos hallazgos evidencian que LIN28 también regula la expresión génica de manera independiente de Let-7 y juega un papel importante en la regulación traduccional. La función de LIN28 como potenciador traduccional fue confirmada por la interacción entre LIN28 y los complejos de iniciación de la traducción de IGF-2 (Polesskaya, 2007), la estimulación de la traducción proteica de las Ciclinas A y B y la quinasa dependiente de ciclinas CDK4 mediante su unión directa a su región 3'UTR o a la región codificante del mRNA de la Histona H2a (Xu, 2009). Adicionalmente, se ha observado que LIN28 se une a la región codificante del mRNA de OCT4 -otro factor de pluripotencialidad clave- a través de su interacción con la RNA helicasa A (RHA) (Qiu, 2010).

Todos estos estudios proporcionan evidencias convincentes de que LIN28 se puede unir de manera directa al mRNA y actuar como regulador postranscripcional, aunque el motivo consenso de unión y el impacto global del papel postranscripcional de LIN28 en el genoma completo permanece sin ser elucidado. Un reciente estudio realizó un crosslinking y una inmunoprecipitación acoplada a una secuenciación masiva de última generación (ChIp-Seq), y obtuvo el motivo GGAGA como putativa secuencia consenso de unión de LIN28 (Wilbert, 2012). Curiosamente, LIN28 incrementó especialmente la traducción de un conjunto de proteínas de unión a RNA e indujo cambios a gran escala en el patrón alternativo de corte y empalme génico (*splicing*). Conjuntamente, todos estos resultados apuntan a que LIN28 juega un extenso papel en la regulación postranscripcional independientemente de su habilidad para silenciar a la familia Let-7.

#### **4.2.- LIN28B en cáncer**

LIN28, al igual que los miRs, es un importante regulador postranscripcional de la expresión génica y su expresión aberrante contribuye al desarrollo tumoral, y su expresión está asociada con estadios avanzados y mal pronóstico en una amplia variedad de tumores humanos (Viswanathan, 2009). Además, estudios previos han demostrado que LIN28B se encuentra también sobreexpresado en el carcinoma tiroideo (Piskounova, 2011). LIN28B es la diana directa más importante de los Let-7 e, inversamente, es un eficiente inhibidor de la biogénesis de esta familia de miRs. La familia de miRs Let-7 son potentes supresores tumorales en la mayoría de los tumores, incluidos los tiroideos (Ricarte-Filho, 2009), y están infraexpresados en todas las neoplasias tiroideas (Braun, 2010; Colamaio, 2012, Pallante, 2006). Así, los datos existentes sugieren que la desregulación aberrante del eje LIN28B/Let-7 en el carcinoma tiroideo podría tener un papel en la progresión tumoral.

## Objetivos



## Objetivos

- 1.- Análisis de expresión de microRNAs en carcinoma papilar tiroideo
  - 1.1.- Identificación de miRs desregulados en CPT
  - 1.2.- Caracterización de miRs desregulados implicados en desdiferenciación y vías de señalización
- 2.- Análisis funcional de microRNAs sobreexpresados en cáncer de tiroides
  - 2.1.- Papel del mir-146b en la regulación de genes de diferenciación
  - 2.2.- Papel del mir-146b en la progresión tumoral tiroidea
- 3.- Análisis funcional de microRNAs infraexpresados en cáncer de tiroides
  - 3.1.- Estudio de la relación LIN28B-mir-30a y su papel en la progresión tumoral tiroidea
  - 3.2.- Estudio de la relación entre la vía PI3K y el mir-30a y su papel en la progresión tumoral tiroideas
  - 3.3.- Análisis de la función del mir-30a en la transición epitelio mesénquima.





## Materiales y Métodos



## 1.- Materiales

### 1.1.- Oligonucleótidos

Oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR

GEN	Oligonucleótido directo (5'→3')	Oligonucleótido reverso (5'→3')	Tamaño del amplicón	Especie
rNis	TGGACTTTGACCCGTGATCCT	ACAAGCAGCGGCATGTACT	292 pb	Rata
rPax8	TACAGCCACACCCCGTAT	AGTGAGCGGCAATGCTGGAA	271 pb	Rata
NIS	CCTCACCAGCACCTACGAGT	CCCACAGCCGTGTAGAAGG	207 pb	Humano
PAX8	CAAGGTGGTGGAGAAGATTG	GAGGTGAATGGTTGCTG	169 pb	Humano
E-CADHERINA	AAGGGCTTGGATTTTGGGCCA	GTGCTGTTCTTCACAGGCTC	362 pb	Rata/Humano
TWIST1	CCGGAGACCTAGATGTCATTG	ATGCAGAGGTGTGAGGATGG	234 pb	Humano
SNAIL1	CACTATGCCGCGCTCTTTC	GGTCGTAGGGCTGCTGGAA	113 pb	Humano
SLUG	GCTCCTTCTCGGTCAAGAA	GGATCTCTGGTTGTGGTATGA	135 pb	Humano
FIBRONECTINA	CCCTTACAGTTCAAGGTTCC	TTCAAGCCTTCGTTGACAGA	164 pb	Humano
VIMENTINA	GACAATGCGTCTCTGGCACGT	TCTTCTGCCTCCTGCAGGTTCTT	236 pb	Humano
ZEB1	GCTGACCAAGAACAGTGTT	CAGAGTCATTCTGATCCTC	211 pb	Humano
ACTINA	CACTCTCCAGCCTTCCTT	CTCGTCATACTCCTGCTTGCT	314 pb	Rata/Humano
TPO	TTTCCTCAAGACGACAAGTGTGGC	AAATCCCATCCTTCCTGGGTGCAA	161 pb	Humano
NKX.2-1/TTF-1	TCCCAGACTCGCTCGCTCATT	CTCATCGACATGATTGCGCGGC	157 pb	Humano
FOXE1	TGAGCCAGCGTAGGGACGAAAA	CCACCTCCTCCCGTTTACAGAGTA	191 pb	Humano
TSHR	GCTTGCTGGACGTGTCTCAAACCA	AGCCCGTGTGAGGTGAAGGAAA	140 pb	Humano
CDK6	GTG GTC AGG TTG TTT GAT GTG	TTT CAG TGG GCA CTC CAG	136 pb	Humano
PTEN	TGGATTGCACTTAGACTTGACC	AGGATATTGTGCAACTCT	211 pb	Humano
hLIN28A	AACCAGCAGTTTGAGGTGG	TTCAAGCTCCGGAACCCCTTC	248 pb	Humano
hLIN28B	TGCAGAAGATCACTCCGTTCC	TCCATGAATAGTTTGCTTTGGTGT	288 pb	Humano
rLin28A	GTCTTTGTGCAACAGAGCAA	CGTCGCTCACTCCAATACA	155 pb	Rata
rLin28B	CGTGGAAGTGGCACTGTAA	TCCATGAATAGTTTGCTTTGGTGT	131 pb	Rata
HMG2	CTCAAAAGAAAGCAGAAGCCAC	GGCAGACTCTTGAGGATG	128 pb	Humano
rHmga	AGAGACCCAGAGGAAGACCC	TTGTTGGGCCATTCCTGG	122 pb	Rata
E2F3	GCGGTATGATACGTCTCTTGGT	AGACTGCAGCCCATCCATTG	207 pb	Humano
ADRB2	TGTGTCAGGCCCTTACCTCCT	TGCCCTTTGGCCTCCTGAAA	210 pb	Humano
TRAF6	AGTGTCTGTGTCCGTCCTCT	ATCACTTGCTCTGATTCTCTCCT	205 pb	Humano
IRAK1	CTGGAGTGGCTTTGAGAAGCA	TTCTCTAGCCTCTCGTACACCTGG	226 pb	Humano
IYD	CTAGCTGCCCTGCAGGTAAAT	GCCACAGTTGAGAGGAGTGG	172 pb	Humano
HRAS	CATCCACCAGTACAGGGAGC	TTGTGCTGCGTCAGGAGAG	305 pb	Humano
EYA1	AGCCTGGCTGCAGTTGAGGGCC	AGTCGGTCAGGGCTTCAATTT	44 pb	Humano
EYA2	TAAACCTCATCAACTCCCGCCCAA	GGTGACCAGCACATTGACACA	47 pb	Humano
SIX	GCCAAGGAAAGGAGAACCCGAA	TTCTGAGCTGGACATGAGCGGCTT	102 pb	Humano
PAI	AAAGGCAACATGACCAGGCT	TGGAGAGGCTCTTGGTCTGAA	161pb	Humano
SnoRNA 142	TTAGTGCCACGTGTCTGGGC	TCAGTTCATCATGGTGTCTCAG	46 pb	Humano
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT	94 pb	Humano

Tabla. 1-. : Lista de oligonucleótidos utilizados para qPCR.

**Oligonucleótidos directos qPCR microRNAs (5'→3').**

Usados con oligo reverso universal (Invitrogen) generan un amplicón de aproximadamente 60 pb.

miR	Oligo	miR	Oligo
hsa-miR-10b-5p	TACCCTGTAGAACCGAATTTGTG	hsa-miR-373-3p	GAAGTGCTTCGATTTTGGGGTGT
hsa-miR-100-5p	AACCCGTAGATCCGAACCTTGTG	hsa-miR-378a-3p	ACTGGACTTGGAGTCAGAAGG
hsa-miR-146b-3p	TGCCCTGTGGACTCAGTTCTGG	hsa-miR-451a	AAACCGTTACCATTACTGAGTT
hsa-miR-146b-5p	TGAGAACTGAATCCATAGGCT	hsa-miR-486-5p	TCCTGTACTGAGCTGCCCCGAG
mo-miR-146b-3p	CCTAGGGACTCAGTTCTGGTG	hsa-miR-520d-5p	CTACAAAGGGAAGCCCTTTC
hsa-miR-15a-5p	TAGCAGCACATAATGGTTTGTG	hsa-miR-520d-3p	AAAGTGCTTCTCTTTGGTGGGT
hsa-miR-185-5p	TGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGA	hsa-miR-520a-5p	CTCCAGAGGGAAGTACTTTCT
hsa-miR-185-3p	AGGGGCTGGCTTTCCTCTGGTC	hsa-miR-520a-3p	AAAGTGCTTCCCTTTGGACTGT
hsa-miR-21-5p	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	hsa-let-7a-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
hsa-miR-21-3p	CAACACCAGTCGATGGGCTGT	hsa-let-7b-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT
hsa-miR-221-3p	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC	hsa-let-7c-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT
hsa-miR-23b-5p	TGGGTTCTGCGCATGCTGATTT	hsa-let-7d-5p	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT
hsa-miR-23b-3p	ATCACATTGCCAGGGATTACC	hsa-let-7e-5p	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT
hsa-miR-24-3p	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG	hsa-let-7f-5p	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT
hsa-miR-339-5p	TCCCTGTCCTCCAGGAGCTCACG	hsa-let-7g-5p	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT
hsa-miR-339-3p	TGAGCGCCTCGACGACAGAGCCG	hsa-let-7i-5p	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT
hsa-miR-340-3p	TCCGTCTCAGTTACTTTATAGC	hsa-miR-138-5p	AGCTGGTGTTGTGAATCAGGCCG

**Tabla. 2- : Lista de oligonucleótidos directos utilizados para qPCR de microRNAs.**

**Oligonucleótidos utilizados en la generación de vectores y constructos.**

por PCR	Oligonucleótido directo (5'→3')	Oligonucleótido reverso (5'→3')
Clonaje mir-Let-7a2	TCGAGGATCCGCCCAAATAGGTGACAGCACG	TCGAGCTAGCAAATACCATAAAATAATCGTA
Clonaje mir-Let-7e	TCGAGGATCCCAAGCTCGTGTCTGTGGGTC	TCGAGCTAGCTTTCAGGGGAAGGAGGGGAT
Clonaje mir-Let-7i	TCGAGGATCCTGCTGGGCGGGGTCT	TCGAGCTAGCCCCCGGAAAACAAAGGGGA
Clonaje mir-Let-7f	TCGAGGATCCGCTTCTGTCTTATTCTCTGTGTC	TCGAGCTAGCTCTGTGCCTACTGTACTACTTGAAC
Clonaje mir-100	TCGAACGCGTTCCACCTCAGCCCCCTTTTC	TCGAGAGCTCTGGGACGAAGTCCTTTCCATT
Clonaje mir-138	TCGAGAGCTCGCATATGCTTCTCCCGGT	TCGAGCTAGCAGGGTCTCTGTGACGGG
Clonaje mir-146b	TGCAGGATCCCCTTATGTGACCCATCCTGG	TGCAGCTAGCTGGGCCTGCAGAAGCAC
Clonaje mir-146b rata	TGCAGGATCCATCTCACATGCCCTCTGTGC	TGCAGCTAGCCCAAAGAGTCTCCAGGAGCG
Clonaje mir-15a	TGCAGGATCCAGTTAATACTGGAGATAATTTAGA	TGCAGCTAGCAATAATTATGCATATTACATCAATG
Clonaje mir-23b	TGCAGGATCCACGAACAACAAACAGAACTCCA	TGCAGCTAGCGGTGACCGGTGAGCATCTTC
Clonaje mir-373	TGCAGGATCCTTCCCCATAGCAAGCAAGTT	TGCAGCTAGCATGGAGCATACAGACTGGTG
Clonaje mir-378a	TGCAGGATCCGCCGGAAGAGGACCTG	TGCAGCTAGCATTCTCTTGCGGCACCACC
Clonaje mir-339	TGCAGGATCCCCCTTCCATGTTGATACCGA	TGCAGCTAGCTTCTGAGAAGGGGCCACAGG
Clonaje mir-520a	TGCAGGATCCCATGCAAACAGGGCCAGGA	TGCAGCTAGC ACAGAGACCCTGTCTTGGAG
Clonaje mir-520d	TGCAGGATCCAGATTCCAGAAAATATGCAAACAGG	TGCAGCTAGCGCAACACAGAGCCTTAGAATAAA
3'UTR rNis	AATTTCTAGATCTGAGGGTGGGGTCCAAG	AATTTCTAGATGTTAGACACAAAAGCTGGGC
3'UTR rPax8	AATTTCTAGACATGGGGACAGTGGGAACAA	AATTTCTAGAGCCCAACATAGTAGGGAGACA
3'UTR hNIS	AATTTCTAGACGAGACCAGCAGGAGACAACTCTC	AATTTCTAGACTCTGACAGTTCTAGCAGCCAGAAG
3'UTR PAX8	AATTTCTAGAACTCCAGCTTGCTGAGTTCC	AATTTCTAGATGAGTTGGAAAGGGTCTGCC
3'UTR FOXE1	AATTTCTAGATCCCGGTGGGATAGATCGG	AATTTCTAGA TCCCCATTTGGAAGTGAACCA

**Por hibridación de hebras**

**Hebra positiva (5'→3')**

INS146b3pNIS7nt	CTAGTACAGGGCGGAACCTTACAGGGCA
INS146b5pPER	CTAGTAGCCTATGGAATTCAGTTCTCACCAATTGGAGCCTATGGAATTCAGTTCTCAA
INS146b3pPER	CTAGTCCAGAACTGAGTCCACAGGGCAGGAATCCCCAGAACTGAGTCCACAGGGCAA

**Hebra negativa (5'→3')**

INS146b3pNIS7nt	CTAGTGCCCTGTAAGGTTCCGCCCTGTA
INS146b5pPER	CTAGTTGAGAACTGAATTCATAGGCTCCAATTGGTGAGAACTGAATTCATAGGCTA
INS146b3pPER	CTAGTTGCCCTGTGGACTCAGTTCTGGGAATTCCTGCCCTGTGGACTCAGTTCTGGA

**Tabla. 3-. : Lista de oligonucleótidos utilizados para el clonaje de miRs y generación de vectores reporteros de Luciferasa**

## 1.2.- Anticuerpos

PRIMARIOS	Casa	Referencia	Dilución WB	Dilución IF
$\beta$ -actina	Santa Cruz	1616R	1/1000	
AKT1/2 (H-136)	Santa Cruz	8312	1/1000	
pAKT1/2 ser473	Santa Cruz	7985	1/1000	
BCL2	Santa Cruz	7382	1/1000	
E-cadherina BD	BD Transduction Labs	610182	1/1000	
FOXE1 (TTF-2)	Santa Cruz	16392	1/1000	
FOXO1 (L27)	Cell Signalling	9454	1/1000	1/200
hNIS	Regalo de la Dr. Nancy carrasco		1/1000	
NKX2-1 (TTF-1)	Biopat	PA 0100	1/1000	
LIN28B	Cell Signaling	4196	1/1000	
PAX8	Biopat	PA 0300	1/1000	
PI3KB	Santa Cruz	602	1/1000	
PTEN	Cell Signalling	9552	1/1000	
p27 (M-197)	Santa Cruz	776	1/1000	1/200
RAS	Oncogene	AB4	1/1000	
HRAS	Santa Cruz	520	1/1000	
TPO (MoAb47)	Santa Cruz	5286	1/1000	
$\alpha$ Tubulin (B-7)	Santa Cruz	58432	1/500	
SECUNDARIOS	Casa	Referencia	Dilución WB	Dilución IF
Goat anti rabbit IgG-HPR	Santa Cruz	2004	1/10000	
Anti rabbit para IP	Jackson Labs	211-032-171	1/10000	
Goat anti mouse IgG-HPR	Santa Cruz	2005	1/10000	
Anti rabbit acoplado a Alexa 488	Molecular probes	A11034		1/500
Anti rabbit acoplado a Alexa 546	Molecular probes	A11035		1/500
Anti mouse acoplado a Alexa 488	Molecular probes	A11029		1/500
Anti mouse acoplado a Alexa 546	Molecular probes	A11030		1/500

**Tabla. 4.-: Lista de anticuerpos utilizados para Western Blot e Inmunofluorescencia.**

## 1.3.- Plásmidos

-Vectores de expresión de miRs: los precursores de miRs fueron clonados en el vector de expresión pEGP-miR (Cell Biolabs), específicamente en los sitios de restricción de las enzimas BamHI y NheI. La sobreexpresión constitutiva de cada miR fue confirmada evaluando los niveles de expresión por qRT-PCR en cada tipo celular. El vector pEGP-Null (Cell Biolabs) fue usado como su condición control.

-Vectores reporteros de desestabilización de RNA por ribointerferencia: los 3'UTR de NIS y PAX8 de humano y rata, y de FOXE1; y los constructos INS146b3pNIS7nt, INS146b5pPER e INS146b3pPER fueron clonados en el vector reportero pGL3-control en el sitio de restricción de la enzima XbaI tras ser generados con los oligos mencionados anteriormente (Tabla 3) a partir de una reacción de PCR o la hibridación directa de ambas hebras.

-pGL3-Basic-NUE-3'UTRNIS: Vector reportero que contiene el promotor distal (NUE: *NIS upstream enhancer*) y el extremo 3'UTR de NIS clonados corriente arriba y abajo de la luciferasa respectivamente en el vector reportero pGL3-Basic.

-pCDNA3-GFP-PTEN: vector de expresión de PTEN humano. Fue comprado a Addgene (Plasmid #13039). PCDNA3 fue usado como su vector control.

-pGL3-Control-PTEN-3'UTR-Wt: vector que contiene el gen testigo de la Luciferasa fusionado al 3'UTR de LIN28B. Este vector fue donado por Joshua Mendell (Addgene # 21326).

-pCMV2-LIN28B: vector de expresión de LIN28B humano. El vector sin inserto pCMV2 fue usado como su condición control. Donado por el Dr. Richard I Gregory, Harvard University, Boston (USA)

-pCMV2-miR30a: vector de expresión del precursor miR-30a humano. El vector sin inserto pCMV2 fue usado como su condición control. Este vector fue donado por Bryan Cullen (Addgene plasmid # 20670)

-psiCheck2-LIN28B3'UTR: vector que contiene el gen testigo de la Renilla fusionado al 3'UTR de LIN28B. Expresa Luciferasa de manera constitutiva bajo el control del promotor de la tirosín quinasa. Donado por el Dr. Richard I Gregory, Harvard University, Boston (USA)

#### **1.4.- Líneas celulares**

##### **PCC13**

Línea celular epitelial tiroidea de rata, obtenida a partir de cultivos primarios de tiroides de rata Fischer de 18 meses de edad (Fusco, 1987). El crecimiento de esta línea es dependiente de TSH e insulina o IGF1. Esta línea expresa los marcadores de diferenciación tiroideos (TG, TPO, NIS y

TSHR) así como los factores de transcripción específicos de la glándula tiroidea (Pax8, Nkx2-1 y FoxE1), por lo que son un buen modelo para estudiar los procesos de proliferación y diferenciación.

### **MDCKhNIS**

Línea celular Madin-Darby canine kidney (MDCK), generada a partir de riñón de perro, y transfectada establemente con el cDNA de NIS humano para imitar las propiedades cinéticas de captación de Yodo de una célula folicular tiroidea (Zuckier, 2004)

### **Nthy-ori 3-1**

Línea celular tiroidea humana normal (Lemoine, 1989).

### **Células PC-HRAS**

Células PCC13 transfectadas de forma estable con el vector de expresión del oncogén HRASVal12 (Shirokawa, 2000) inducible por doxiciolina.

### **Líneas tumorales humanas**

Obtenidas a partir de cultivos primarios de tumores de tiroides de pacientes que desarrollaron CFT, CPT o CAT. Su origen se resume en la tabla 5.

<b>Línea celular</b>	<b>Tipo de cáncer</b>	<b>Origen</b>	<b>Medio</b>	<b>Referencia</b>
BCPAP	CPT	Massimo Santoro	DMEM	Fabien, 1994
KTC-1	CPT	Junichi Kurebayashi	RPMI	Sato, 2000
TPC1	CPT		DMEM	Ishizaka, 1989
FTC-133	CFT	ECACC	DMEM	Rao, 2005
WRO	CFT		RPMI	Estour, 1989
T238	CAT	Lucía Roque	RPMI	Chung, 2002
FRO	CAT		RPMI	Nishihara, 1997
KTC-2	CAT	Junichi Kurebayashi	RPMI	Kurebayashi, 2003
CAL62	CAT	DSMZ	DMEM	Gioanni, 1991
8505c	CAT	DSMZ	RPMI	Iti, 1993
SW1736	CAT	Dr. Erik Heldin	DMEM	Xu, 2003
Hth7	CAT	Dr. Erik Heldin	MEM	Heldin, 1991
Hth74	CAT	Dr. Erik Heldin	MEM	Heldin, 1991
Hth83	CAT	Dr. Erik Heldin	MEM	Heldin, 1991
C643	CAT	Dr. Erik Heldin	MEM	Heldin, 1991
NThy-ori-3-1	Tiroidea no tumoral	ECACC	RPMI	Lemoine, 1989
HeLa	Carcinoma cervix	ECACC	DMEM	

**Tabla. 5-: Lista de líneas celulares tumorales humanas**



## 1.5.- Muestras tisulares tiroideas

Para el experimento de secuenciación masiva de siguiente generación, se recogieron muestras de CPT (n=8) y de su tejido contralateral normal del mismo paciente (n=8) del Biobanco del Hospital Universitario de la Paz (Madrid). Las características clinicopatológicas de los pacientes están resumidas en la tabla 6. Una cohorte independiente de nueve muestras de CPT fue usada para validar la secuenciación por qPCR.

ID Paciente	Género	Diagnóstico	TNM	Patología tiroidea concomitante	Tiroidectomía total	T: Tumoral N: Tejido normal Lobulo contralateral
#1	F	Variante folicular de CPT	T1NxM0	No	Si	T/N
#2	F	Variante oncocítica de CPT	T3N0M0	No	Si	T/N
#3	F	Variante clásica de CPT	T2NxM0	No	Si	T/N
#4	F	Variante clásica de CPT	T3N1aM0	Tiroiditis linfocítica	Si	T/N
#5	F	Variante clásica de CPT	T2NxM0	No	Si	T/N
#6	F	Variante folicular de CPT	T3NxM0	No	Si	T/N
#7	F	Variante folicular de CPT	T1NxM0	No	Si	T/N
#8	F	Variante clásica de CPT	T3NxM0	No	Si	T/N

**Tabla. 6-. Principales características clinicopatológicas de los pacientes.** Género, variante histológica, estadio, enfermedad tiroidea concomitante y tiroidectomía total.

## 2.- Métodos

### 2.1.- Cultivos celulares

Las células PCC13 se cultivaron en medio COON's Ham's F12 modificado, suplementado con un 5% de suero DONOR y con una mezcla de 6 hormonas consistente en: somatostatina 10mg/ml, transferrina 5µg/ml, hidrocortisona 10nM, glicil-L-histidil-L-lisina 10ng/ml, TSH 1nm e insulina 10µg/ml (Sigma). En este trabajo, nos referiremos a este medio como medio completo o 6H.

Para determinar el efecto de los distintos estímulos sobre las células PCC13, estas se mantuvieron durante 48 horas en un medio similar al anteriormente mencionado, pero en ausencia de TSH e insulina y con una concentración de suero mínima (0,2%). A partir de ahora denominaremos a este medio, medio basal (-) o 4H. En este estado, las células se encuentran en un estado de quiescencia y no expresan los factores de diferenciación tiroideos. Tras 48 horas en medio 4H, las células se trataron con los compuestos y concentraciones siguientes: TSH (0,5 mU/ml, Sigma); IGF1 (100ng/µl, Peprotech); y TGFβ (10ng/µl, Peprotech). El tiempo de incubación con estos estímulos varió según el ensayo como se explica en las correspondientes secciones de resultados.

Las células PC-HRAS se cultivaron en medio de selección (medio 6H suplementado con 300 mg/ml de geneticina y 120 µg/ml de higromicina). Para realizar los ensayos, se cultivaron en medio 4H durante 48 horas y posteriormente se les añadió 1µg/ml de doxiciclina para estimular la expresión del oncogén HRAS

Las líneas tumorales humanas se cultivaron en el medio indicado en la tabla 5, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS).

## **2.2.- Métodos de determinación de niveles de RNA**

### **2.2.1.- Extracción de RNA**

Cada tipo celular fue cultivado en su medio correspondiente (Tabla 4 Líneas celulares) o en 4H con los tratamientos indicados. Posteriormente las células se lavaron con PBS (Tampón fosfato pH 7 en suero salino) a 4°C, y el RNA se extrajo utilizando Trizol (Sigma) siguiendo las instrucciones del proveedor. La cantidad de RNA y su pureza se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280nm.

### **2.2.2.- RT-PCR**

Para obtener cDNA a partir del mRNAs de cada una de las muestras 1,5 µg de RNA fueron retrotranscritos añadiendo 200 ng de dNTPs, 200ng de oligos aleatorios o “random primers” y agua destilada hasta un volumen final de 14 µl. Se desnaturalizó 10 minutos a 65°C, y se incubó 2 minutos en hielo. Posteriormente se añadieron 200U de la retrotranscriptasa M-MLV (Promega), 40U del inhibidor de RNAsas RNaseOUT (Invitrogen), y el tampón comercial de la M-MLV en un volumen final de 20 µl y se programaron en un termociclador los siguientes gradientes térmicos: 10 minutos a 25°C, 15 minutos 37°C, 15 minutos 40°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 95°C. El cDNA se diluyó 5 veces en agua bidestilada (80 µl, para un volumen final de 100 µl) y se utilizó 1,5 µl por reacción de PCR o qPCR.

Por otro lado, para obtener cDNA a partir de miRs, 200 ng de RNA fueron poliadenilados y retrotranscritos con el *NCode miRNA First-Strand cDNA Synthesis and qRT-PCR* Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen)

Al igual que en el caso del cDNA obtenido a partir de mRNA, el producto de retrotranscripción (20 µl) se diluyó 5 veces en agua bidestilada (80 µl, para un volumen final de 100 µl) y se utilizó 1,5 µl por reacción de PCR o qPCR.

Los oligonucleótidos utilizados se resumen en la tabla de los oligonucleótidos. Aquellos

proyectados para qPCR fueron diseñados i) para hibridar en las uniones exón-exón de los genes codificantes, lo cual evita la amplificación del DNA genómico para amplificar exclusivamente el mRNA retrotranscrito; o ii) como secuencia idéntica de las hebras maduras en el caso de los miRs siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los productos de PCR y qPCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa y visualizados con una lámpara UV para confirmar su tamaño.

### **2.2.3.- PCR cuantitativa (qPCR)**

Las PCR cuantitativas se realizaron utilizando reactivos de la plataforma SYBR GREEN en los siguientes volúmenes: 5 µl de KAPA SYBR FAST 2X, 0,2 µl de ROX, 0,3 µl de cada primer a 10 nM, 1,5 µl de cDNA diluido 1:5, y 2,7 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada para un volumen final de 10 µl. El ensayo se efectuó en el aparato de PCR: Mx3000P QPCR system (Agilent) y cada condición se analizó por triplicado. La amplificación fue llevada a cabo con los siguientes parámetros: i) Para genes codificantes: 8 mins de desnaturalización inicial a 95°C, 40 ciclos trifásicos de: 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 57-63°C y 30 segundos a 72°C; y una extensión final de 10 minutos a 72°C. O ii) Para miRs: 8 mins de desnaturalización inicial a 95°C, 40 ciclos bifásicos de: 15 segundos a 95°C y 30 segundos a 60-63°C; y una extensión final de 5 minutos a 60-63°C, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen).

La especificidad de hibridación de cada par de oligos fue comprobada i) inicialmente por visualización del amplicón con UV tras someter a las muestras a electroforesis en gel de agarosa y ii) para cada reacción observando su curva de disociación. El umbral de señalización para cada gen fue determinado por el MxPro QPCR Software teniendo en cuenta el nivel de señal medio de cada gen substrayendo la fluorescencia basal.

La expresión relativa de cada gen se determinó utilizando el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Giulietti, 2001). Los niveles de expresión de cada producto de PCR fueron normalizados con respecto a la  $\beta$ -actina en caso de los genes codificantes y con U6 o Sno142 en el caso de los miRs.

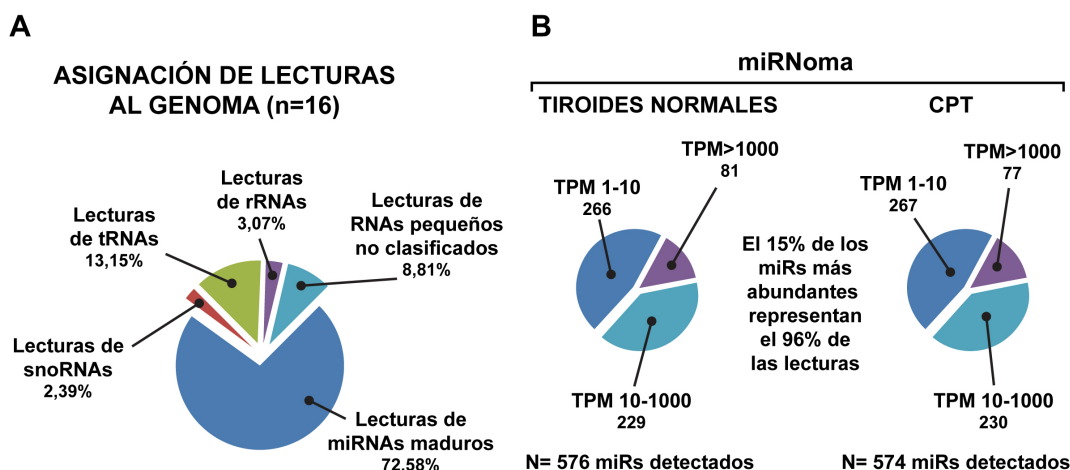
### **2.2.4.- Secuenciación de última generación**

El procedimiento de secuenciación fue llevado a cabo en la Unidad de Genómica del CNIO (Madrid). El análisis Bioinformático fue realizado por Javier Perales, bajo la supervisión del Dr. David Pisano, en la Unidad de Bioinformática del CNIO (Madrid). Se usó la Plataforma de Análisis Genómico IIX (Illumina®) y los protocolos estándar recomendados para secuenciación de RNA de pequeño tamaño (Illumina® TruSeq® Small RNA) y de secuenciación de RNA mensajero

(Illumina® TruSeq® Stranded mRNA).

Los adaptadores 3' de las lecturas de RNA pequeño fueron eliminados usando el software Cutadapt (v. 1.2.1), filtrando las lecturas con longitudes comprendidas entre 17 y 34 nt. Las lecturas resultantes fueron alineadas con el genoma humano (versión 19 del buscador genómico de la UCSC) usando el algoritmo de Bowtie (v0.12.7) (Langmead, 2009) con el criterio de homología perfecta. Las lecturas alineadas con cada localización genómica de un miR maduro fueron contabilizadas usando el software HTSeq-count (v. 0.5.4), y nombradas según la notación de la versión 20 de miRBase (ensamblaje hg19, Junio 2013).

Las lecturas limpias -las resultantes tras descartar aquellas contaminadas con bases ambiguas y restos de adaptadores- fueron usadas para un ulterior análisis. Aquellas lecturas clasificadas como RNA pequeño de otro tipo (rRNA, tRNA, scRNA, snRNA, snoRNA, rasRNAs y mRNAs) fueron excluidas (Fig. 13).



**Fig. 13.- Asignación de lecturas al genoma. Panel izquierdo:** Diagrama de sectores mostrando la alineación de lecturas de entre 18 y 25 nt con el genoma dividida en las principales categorías de RNA pequeño. **Panel derecho:** Diagrama de sectores mostrando los miRs detectados en tejido normal o de CPT clasificado según su abundancia: 1-10 CPMs: baja; 10-1000: intermedia; >1000: abundante.

Las lecturas de mRNAs fueron alineadas con el genoma humano (versión 19 del buscador genómico de la UCSC) usando el software TopHat v.2.0.4 (Trapnell, 2009) con un criterio de permisividad de 2 desemparejamientos y un máximo de 5 impactos múltiples.

El nivel de expresión génica fue calculado como la suma de todas las lecturas de los exones utilizando para ello el software Htseq-count (v. 0.5.4), y nombradas según la notación del genoma de referencia (ensamblaje hg19, Junio 2013) (Anders, 2015). Los datos de secuenciación íntegros están disponibles en Gene Expression Omnibus (GEO) con el código de acceso GSE63511.

## **2.3.- Métodos de determinación de niveles de proteína**

### **2.3.1.- Extracción de proteínas**

Tras cultivar y tratar cada tipo celular de la manera anteriormente mencionada, las células se lavaron con PBS frío 2 veces y se lisaron en tampón RIPA (PBS, con 1% NP-40, 1% SDS y 0,5% deoxicolato sódico, suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas). Posteriormente se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C y se conservaron los sobrenadantes conteniendo las proteínas solubles. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976), realizando una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) para la determinación de las concentraciones.

### **2.3.2.- Western Blot e Inmunodetección**

Extractos proteicos soluble (30µg) total fueron separados en geles de poliacrilamida al 7% (con SDS al 0,1% como desnaturalizante) y transferidos a membranas de nitrocelulosa. A continuación se comprobó la eficiencia de la transferencia tiñendo las membranas con Rojo Ponceau 2 minutos y tras 3 lavados con agua destilada se bloquearon 1h a temperatura ambiente con la solución de PBS-Tween (PBS con Tween-20 al 0,1%) con leche desnatada en polvo al 5%. Tras una incubación de 15-18h a 4°C (1hora a temperatura ambiente para la actina) con los anticuerpos primarios suspendidos en solución de bloqueo (a la concentración indicada en la tabla de anticuerpos), se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween, para posteriormente ser incubados 1hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa. Tras dos lavados con PBS-Tween y uno con PBS, se incubaron las membranas 2 minutos con el sustrato quimioluminiscente (ECL) para la detección de la peroxidasa (ThermoFischer). A continuación se expusieron películas radiográficas sobre la membrana y las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas. Estas bandas fueron cuantificadas densitométricamente con el software de imagen ImageJ.

Al menos 3 experimentos independientes fueron realizados para calcular la media y la desviación standard de los niveles proteicos, de los cuales un experimento representativo es mostrado como figura.

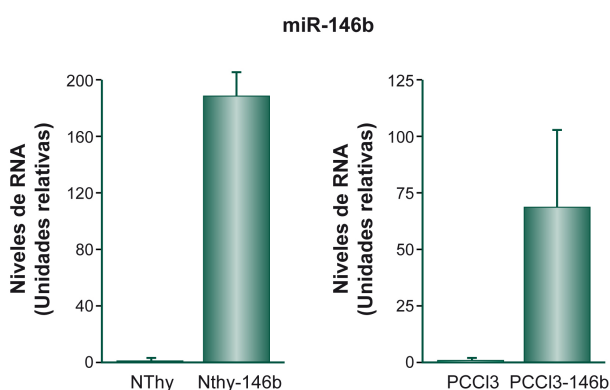
### 2.3.3.- Inmunofluorescencia celular

Para la realización de inmunofluorescencias, las células sembradas en cubreobjetos fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 min. Después de tres lavados con PBS, las células fueron permeabilizadas con PBS con 0,1% TritonX-100 durante 15 minutos e incubadas en solución de bloqueo (PBS, 1% BSA) durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron durante 15-18h a 4°C con el anticuerpo primario (utilizando las concentraciones para IF indicadas en la tabla de anticuerpos) suspendido en solución de bloqueo y en cámara húmeda. Tras otros tres lavados con PBS se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa flúor 488 o 546 en solución de bloqueo. Finalmente los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS -la última vez conteniendo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en proporción 1:10000 para la tinción de los núcleos- y una vez con H<sub>2</sub>O destilada y se colocaron sobre portas utilizando “Prolong” como medio de montaje (Invitrogen).

Las células fueron observadas y fotografiadas con un objetivo de inmersión en aceite de 63X y un zoom de 2.3 en un microscopio confocal Espectra Leica TCS SP5 (Leica Corp., Deerfield, IL, USA).

### 2.4.- Generación de líneas celulares estables

Hemos generado al menos 3 poblaciones clónicas distintas de cada condición, para obtener distintos sets de células con una sobreexpresión constitutiva de distintos microRNAs. Para ello transfectamos 10 µg de los vectores pEGP-mir-146b, pEGP-mir-15a, pEGP-mir-23b, pEGP-mir-373 y pEGP-Null en las líneas celulares NThy-ori, PCCI3 y MDCK-hNIS sembradas en placas de cultivo celular p100. Tras 48 horas se trataron con Puomicina durante 72 horas y se aislaron clones individuales, que tras semanas de crecimiento dieron lugar a poblaciones clónicas de células expresando los distintos miRs.



**Fig. 14.- Generación de líneas con expresión constitutiva del miR-146b.** Se evaluó el nivel de expresión del cada miR en los clones obtenidos por dilución límite. Niveles de expresión del miR-146b analizados por qRT-PCR en células NThy-ori y PCCI3 comparados con la línea control *Null*. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes.

La sobreexpresión constitutiva de los miRs fue verificada en todos los clones por qRT-PCR.

Seleccionamos las líneas celulares Nthy-ori y PCCl3 para realizar estudios de ganancia de función del mir-146b y estudiar sus dianas dado que estas dos líneas celulares expresan unos niveles moderados de este miRNA. La transfección estable del pre-mir-146b resultó en un aumento de entre 75 y 200 veces en los niveles de la hebra madura de miR-146b-5p (Fig. 14). Este incremento está en el mismo orden de magnitud que el observado entre el tejido tiroideo normal y su contraparte tumoral, que fue de 35 veces.

## **2.5.- Transfecciones transitorias**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células PCCl3 u  $8 \times 10^4$  células de líneas humanas en placas de 12 pocillos,  $2 \times 10^5$  células PCCl3 o  $1,5 \times 10^5$  células respectivamente en placas p60. Tras 24 horas se cambió el medio y se procedió a transfectar con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. En las transfecciones con vectores de expresión se mantuvo constante la cantidad de DNA de cada condición añadiendo la cantidad apropiada de un vector control (pEGP-Null, pcDNA3.1 o CMV2). En los ensayos de desestabilización del 3'UTR y de actividad de los promotores, las células fueron cotransfectadas con 75-300 ng del vector de expresión de luciferasa correspondiente, junto con 35 ng del vector de expresión de Renilla bajo el control del promotor de CMV, para controlar la eficiencia de transfección (menos en los ensayos con vectores Psi-Check2, que incorporan en su secuencia ambas luciferasas).

Tras 4 horas en la solución de transfección, las placas se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron en medio completo durante 36-48 horas más. A continuación se lavaron 2 veces con PBS y se recogieron en medio RIPA, en Trizol o en buffer de lisis pasiva (Promega) para medir proteína, RNA o actividad luciferasa respectivamente.

La desestabilización del 3'UTR y la actividad de los promotores se determinó como la relación entre la actividad luciferasa y la actividad Renilla medida con el Dual-Luciferase Reporter Assay kit (Promega, EEUU).

La expresión de los vectores transfectados se determinó mediante WB para las proteínas expresadas por los genes codificantes y mediante qPCR para la expresión de miRs.

Los resultados muestran la media y desviación estándar de al menos tres ensayos realizados por triplicado.

## **2.6.- Ensayo de proliferación**

Como medida del crecimiento celular, se cuantificó el número de células utilizando la tinción con

cristal violeta o con un contador automático de células (TC20 automated cell counter, Bio-Rad). Para ello 24 horas post transfección se sembraron en medio completo  $2 \times 10^4$  células por pocillo de multi-well de 24 pocillos y fueron fijadas o levantadas a los tiempos indicados con 3% de glutaraldehído o con 150-400  $\mu$ l de tripsina respectivamente. Las células fijadas se tiñeron con 0,1% del colorante cristal violeta y fueron fotografiadas y contadas con el software de imagen ImageJ. Las células levantadas se recogieron con 150-900  $\mu$ l de medio y fueron incubadas con el colorante vital Trypan Blue. Aquellas células no teñidas -esto es, con la membrana íntegra- fueron contadas en una cámara de Neubauer. Las gráficas muestran el número de células por campo o por ml, representándose la media y la S.D. de un ensayo por cuadruplicado, representativo de al menos tres experimentos.

## **2.7.- Ensayo de captación de yodo**

Para evaluar la capacidad de captación de yodo en las distintas condiciones, las células fueron incubadas 1 h a 37°C en HBSS conteniendo 20  $\mu$ mol/L KI y carrier-free  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (actividad específica = 100  $\mu\text{Ci}/\text{mmol I}$ ). La radiactividad fue cuantificada en un contador- $\gamma$ . La captación fue expresada como pmoles de  $\text{I}^-$  y normalizada a la cantidad de DNA contenida en cada pocillo. El anión perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ), un inhibidor competitivo de la captación de yodo mediada por NIS fue usado como control una concentración de 80  $\mu$ mol/L.

## **2.8.- Ensayo de invasividad en matrigel**

Para la realización de los ensayos de invasividad en matrigel se utilizó el Kit *BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber* con membranas de policarbonato de poros de 8  $\mu\text{m}$  y se siguieron las instrucciones del fabricante. A las 24 horas de la transfección, se rehidrató el matrigel añadiendo medio suplementado al 2% durante 3 horas y posteriormente se sembraron  $2,5 \times 10^4$  células por cámara suspendidas en 0,75 ml de medio con un 0,2% de FBS, medio en el que previamente habían sido mantenidas durante 6 horas. En placas de 12 pocillos se añadió en cada uno de ellos el medio suplementado con un 20% de FBS, completando así un gradiente quimiotáctico de 0,2, 2 y 20% de FBS.

Las células se incubaron durante 24 o 36 horas (líneas tumorales o NThy-ori respectivamente) para permitir su invasividad y posteriormente se eliminaron las células no invasivas contenidas en la parte superior del matrigel con un bastoncillo de algodón. A continuación, las células que habían atravesado a la parte inferior de la membrana se fijaron con formaldehído al 4% y se tiñeron con cristal violeta. Posteriormente, con ayuda de una hoja de bisturí, las membranas que contenían las



células invasoras fueron reseccionadas y montadas sobre un portaobjetos, se fotografiaron y se cuantificó el número de células por campo. Los resultados representan la media y la S.D. de un ensayo realizado por triplicado.

## **2.9.- Evaluación del ciclo celular**

El análisis del ciclo celular fue efectuado por citometría de flujo. A las 48 horas de la transfección, las células fueron levantadas y tras 2 lavados en medio completo fueron resuspendidas finalmente en PBS. Posteriormente, se fijaron y permeabilizaron con la adición gradual en agitación de Etanol al 70%. Tras 30 minutos en hielo y dos lavados con PBS, fueron resuspendidas en una solución de yoduro de propidio a 45 µg/ml en PBS 1X. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C con 10 µg/ml de RNasa, las células resuspendidas fueron analizadas con el citómetro de flujo Cytomics FC 500MPL (Beckman Coulter). Los datos se analizaron con el software de análisis de citometría CXP.

## **2.10.- Predicción bioinformática de los genes diana**

Los algoritmos TargetScan y miRanda fueron utilizados para predecir hipotéticas interacciones entre miRs y mRNAs. Correlaciones inversas entre los niveles de expresión de los miRs y sus hipotéticos mRNAs diana fueron calculadas con el test de correlación de Pearson, ajustado para testaje múltiple (método de Benjamini & Hochberg; Benjamini, 2001). Aquellas predicciones significativas fueron integradas junto con las interacciones validadas experimentalmente extraídas de las bases de datos TarBase (v.6), miRecords (v.3) y miRTarbase (v.3). El software Cytoscape fue utilizado para representar las resultantes redes de interacción miRs-mRNAs (Shannon, 2013)

## **2.11.- Análisis estadístico**

La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test de dos colas. Las diferencias con respecto a las células sin tratar se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*).



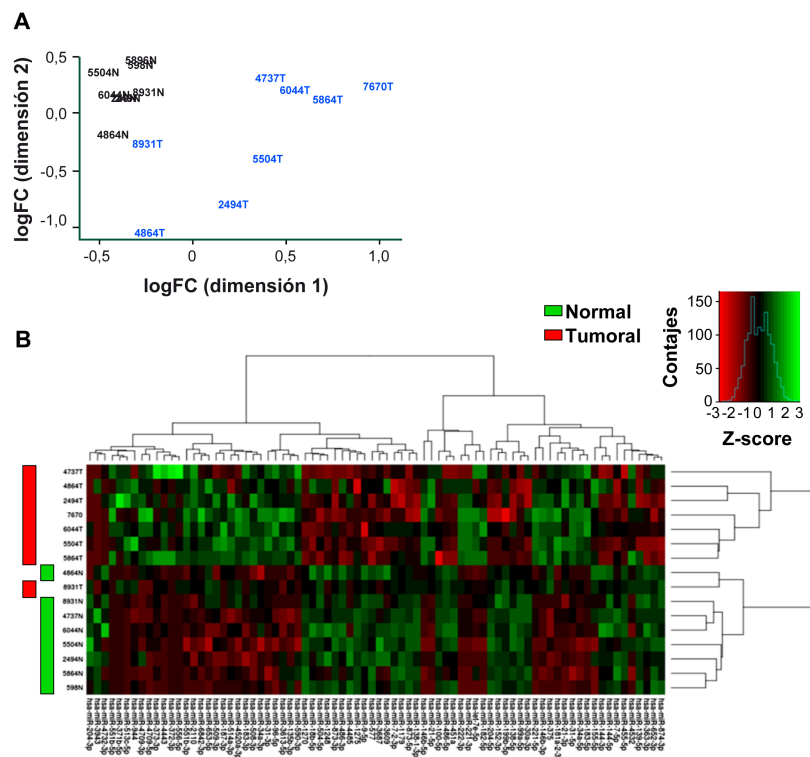
## Resultados



## 1.- Descripción de un circuito regulatorio miR-146b-3p/PAX8/NIS que modula la diferenciación tiroidea

### 1.1.- Determinación de los miRNomas tiroideos normales y de CPT por secuenciación masiva

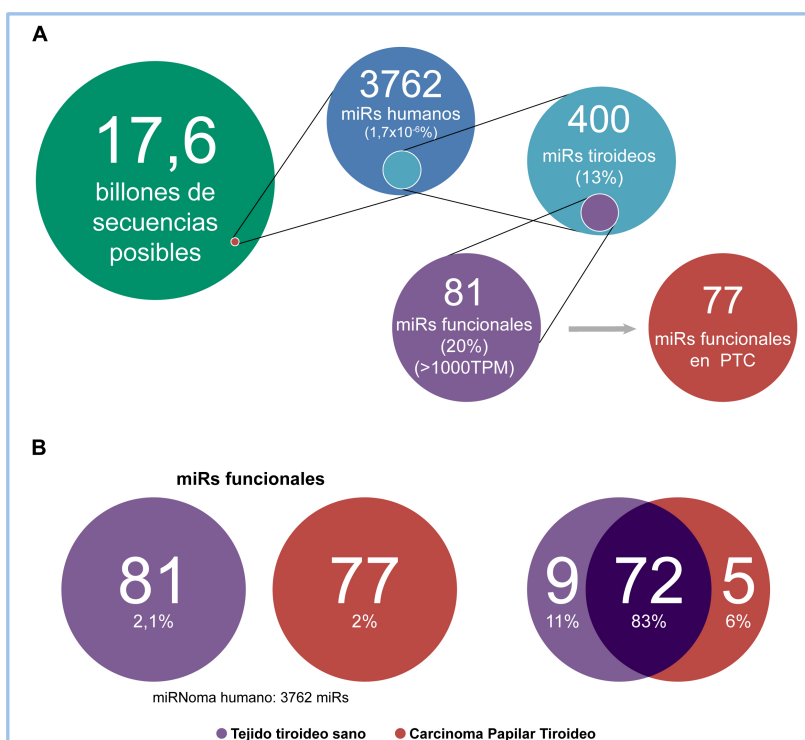
Con el objetivo de llevar a cabo un análisis extenso del miRNoma funcional en el carcinoma papilar tiroideo (CPT), se realizó una secuenciación masiva de última generación de RNA pequeño de muestras procedentes de tejidos tiroideos pareados normales y tumorales de ocho pacientes con CPT. Las muestras proceden del Banco de Tumores del Hospital La Paz, como se indicó en Materiales y Métodos. Aislamos los RNAs de las muestras en nuestro laboratorio y posteriormente fueron secuenciadas en el Servicio de Secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid). La abundancia relativa de cada miR descrito fue normalizada según el parámetro “Cuentas por millón” (CPM) o “Transcritos por millón” (TPM) en cada librería de RNA pequeño. Para obtener una primera información sobre la representatividad de los datos obtenidos, se realizó un análisis de significatividad de la expresión diferencial de miRs y un análisis de agrupamiento jerárquico. Ambos separaron claramente las muestras normales de las tumorales (Fig. 15A y 15B). Estos análisis indican la homogeneidad para cada condición de cada una de las muestras y suponen una gran representatividad para el tipo de carcinoma estudiado.



**Fig. 15.- El patrón de expresión de microRNAs permite diferenciar y agrupar las muestras según su origen tumoral o sano. Panel A:** Análisis de significatividad de la expresión diferencial de miRs: Agrupamiento de las muestras según sus Coeficientes de variación biológica. La dimensión 1 (eje X) separa la condición de pertenecer PTC frente Sano y la dimensión 2 (eje Y) separa a los pacientes. Las diferencias en los patrones de expresión observados por secuenciación masiva son significativas. **Panel B:** Agrupamiento jerárquico de las muestras secuenciadas basado en un análisis de significatividad de microarrays (SAM) de los miRs secuenciados. Las muestras secuenciadas se agrupan por su condición tumoral (Roja) o normal (Verde), no por identidad de paciente.

Hallazgos recientes, (Mullokandov, 2012) demostraron que la abundancia relativa de cada miR con respecto a sus dianas es crucial para determinar el alcance de la represión que ejerce. Por este motivo, solo aquellos miRs de abundancia mayor que 1000 CPM fueron considerados miRs funcionales siguiendo el criterio de Mullokandov.

Teniendo en cuenta estas restricciones, observamos que i) sólo el 13% de todos los miRs humanos son detectables en el contexto tiroideo y ii) sólo aproximadamente el 2% del miRNoma humano (y el 20% del miRNoma tiroideo total detectado) superaron la abundancia umbral para ser considerados funcionales (81/3762 y 77/3762 para el miRNoma tiroideo normal y tumoral respectivamente) contabilizando el 96% de todas las lecturas asociadas a miRs. La mayor parte (83%) de los miRs más abundantes -es decir, del miRNoma funcional- estaban presentes tanto en el tejido tumoral como en el sano identificando un mirona funcional específico (Fig. 16).

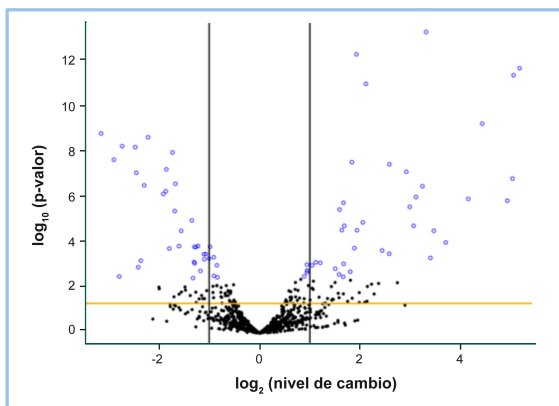


**Fig. 16-. Determinación del miRNoma funcional tiroideo. Panel A:** De 3762 miRs humanos, sólo 400 son expresados en la tiroides. De ellos, sólo alrededor de 80 miRs son considerados como funcionales según el criterio de Mullondakov. **Panel B:** Solo el 2% del miRNoma humano total es funcional en la tiroides. El miRNoma funcional tiroideo normal y el del CPT son solapantes en un 83%.

En conjunto, nuestro análisis de secuenciación clasifica de manera precisa el tejido en normal o tumoral y muestra que el CPT y la tiroides normal expresan una serie similar de miRs abundantes que conforman el miRNoma funcional tiroideo.

### 1.1.1.- Identificación de los miRs funcionales más desregulados en este carcinoma tiroideo

Tras este hallazgo, quisimos saber qué miRs podrían ser candidatos a agentes en la patogénesis del CPT. Para ello, primero seleccionamos aquellos miRs con un nivel de cambio superior a 1,5 veces y un p-valor inferior a 0,01 (Fig. 17).



**Fig. 17.- Identificación de los miRs más desregulados en CPT.** Representación de la significatividad vs el nivel de cambio en un gráfico de dispersión de tipo Volcán. Los puntos azules representan miRs con un nivel de cambio superior a 1,5 veces y un p-valor inferior a 0,01

A continuación, aplicamos el criterio de funcionalidad de Mullondakov y sólo aquellos miRs con una abundancia superior a 1000 CPM fueron considerados como candidatos implicados en la patogénesis del CPT en este trabajo. Al figurar los miRs miR-155, miR-34a y miR-183 muy cerca del umbral de Mullondakov y haber sido descrito con anterioridad como desregulados en CPT (Nikiforova, 2008; Pallante, 2006), decidimos incluirlos en el estudio. Por otro lado, al no figurar miR-21-3p y miR-181a-2-3p en la base de datos TargetScan no pudimos considerarlos para las subsiguientes fases del estudio.

Así, un conjunto de 12 miRs sobreexpresados y 8 infraexpresados fueron seleccionados tras una comparación por pares entre 8 tumores malignos y sus correspondientes muestras normales (Tabla 7). En la lista de miRs sobreexpresados, el miR más abundantemente sobreexpresado es el miR-146b-5p. Curiosamente, el miR-146b-3p, considerado hace unos años como una hebra pasajera no funcional, estaba también entre los miRs sobreexpresados más abundantemente.

En la lista de los miRs infraexpresados, los cuatro más abundantes fueron miR-451a, miR-486, miR-100b y miR-30a. Los miRs desregulados cuya abundancia fue inferior al umbral de 1000 CPM fueron descartados. Aunque su relevancia biológica permanece sin ser probada, no podemos descartar que tengan un papel funcional.

		Media Normal (CPM)	Media Tumoral (CPM)	Nivel de cambio	p-valor	FDR
miRNAs sobre expresados	hsa-miR-146b-5p	1811,75	79891,84	35,9	2,05E-11	4,51E-09
	hsa-miR-21-5p	14129,65	56835,03	3,8	9,15E-11	1,61E-08
	hsa-miR-221-3p	1179,28	11301,82	9,4	4,51E-07	1,90E-05
	hsa-miR-182-5p	2972,44	8713,77	3,0	4,91E-06	1,47E-04
	hsa-miR-222-3p	753,77	6641,46	8,6	1,03E-06	3,96E-05
	hsa-let-7e-5p	1773,24	2839,12	1,8	3,37E-03	3,96E-02
	hsa-miR-31-5p	309,46	1911,69	7,5	4,51E-08	2,84E-06
	hsa-miR-21-3p*	415,64	1600,11	3,6	7,43E-09	5,95E-07
	hsa-miR-146b-3p	36,59	1558,30	33,0	2,00E-12	5,88E-10
	hsa-miR-375	237,74	1390,84	21,4	3,15E-10	4,64E-08
	hsa-miR-181a-2-3p*	462,86	809,28	1,9	4,95E-04	8,39E-03
	hsa-miR-183-5p	213,81	724,28	3,1	1,68E-05	4,50E-04
	hsa-miR-34a-5p	169,50	655,21	4,3	1,50E-12	5,88E-10
	hsa-miR-155-5p	310,22	534,88	2,1	4,18E-03	4,72E-02
miRNAs infra expresados	hsa-miR-451a	29070,32	8055,11	0,22	1,34E-08	9,83E-07
	hsa-miR-486-5p	20534,54	7145,64	0,28	1,49E-06	5,25E-05
	hsa-miR-100-5p	11537,56	6663,36	0,53	4,00E-03	4,58E-02
	hsa-miR-30a-3p	2548,37	1394,93	0,56	2,50E-03	3,15E-02
	hsa-miR-138-5p	2223,51	718,55	0,31	9,06E-08	4,99E-06
	hsa-miR-99a-5p	1909,10	991,79	0,56	5,24E-04	8,41E-03
	hsa-miR-204-5p	1180,71	191,41	0,15	2,40E-09	2,93E-07
	hsa-miR-199b-5p	1003,45	599,95	0,40	2,98E-03	3,66E-02

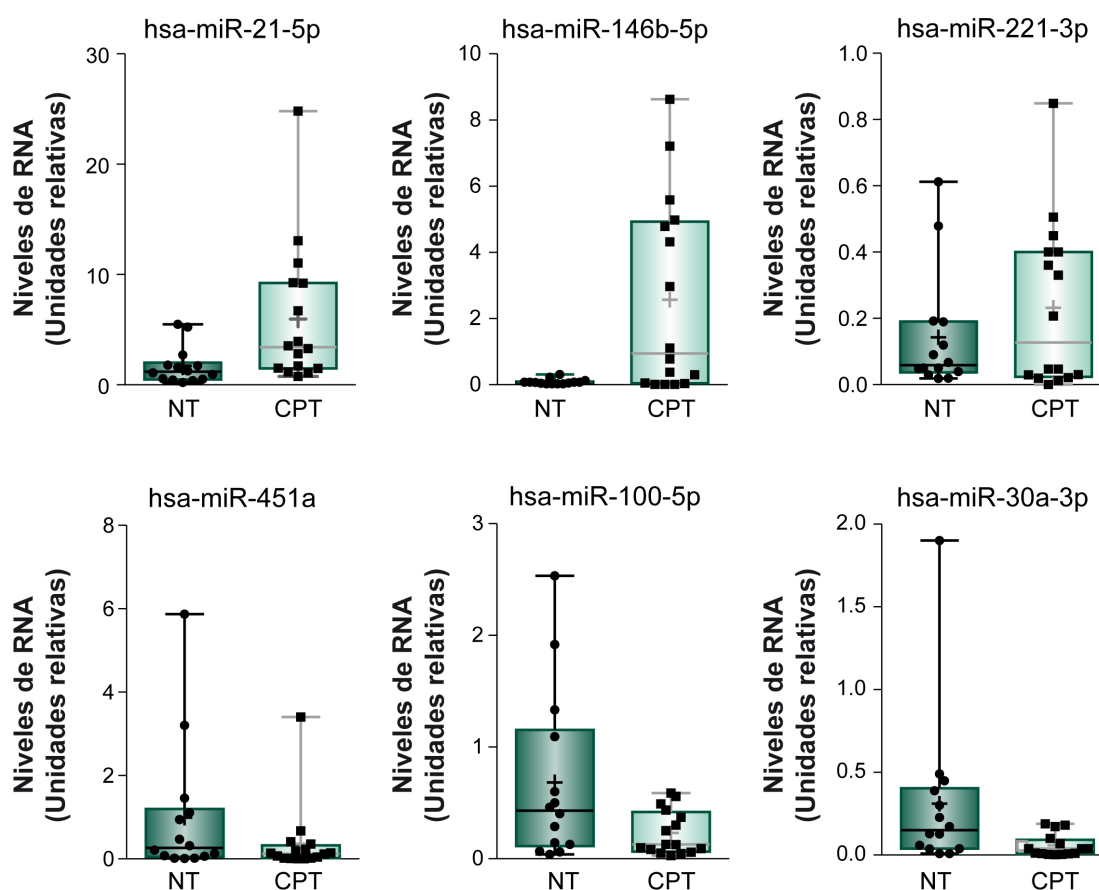
**Tabla 7.- Selección de Candidatos implicados en la patogénesis del CPT:** MiRs funcionales más desregulados en CPT según el criterio de Mullondakov modificado. Con un asterisco se muestran los miRs que no fueron incluidos en el estudio por no figurar en la base de datos TargetScan.

Para verificar la relevancia de los datos obtenidos por esta técnica de secuenciación masiva realizamos una posterior validación por qRT-PCR de varios de los miRs funcionales más desregulados tanto en las muestras originales como en una cohorte independiente de muestras pareadas de nueve pacientes adicionales con CPT (Fig. 18). Conjuntamente, el miRNoma de 10 tiroides normales humanos y su tejido pareado tumoral procedente de CPT nos permitieron identificar los miRs consistentemente desregulados en este tipo de tumor.

## 1.2.- Caracterización del transcriptoma normal y tumoral tiroideo

Para identificar los genes diana de los miRs desregulados más abundantes, en primer lugar procedimos a realizar una secuenciación masiva de última generación (NGS) del mRNA extraído de tejido tiroideo tumoral y normal pareado de los mismos ocho pacientes con CPT. En conjunto, 910 genes se encontraron significativamente desregulados (536 sobreexpresados y 374 infraexpresados).





**Fig. 18-. Validación de los miRs desregulados más abundantes.** Diagramas de caja con los niveles de expresión de 6 miRs desregulados en CPT comparados con el tejido normal (NT) evaluados por RT-qPCR. El análisis fue llevado a cabo con una cohorte independiente de 16 CPT comparados con tejidos normales de pacientes control.

Posteriormente, hicimos una caracterización adicional de las firmas biológicas asociadas a nuestro análisis de secuenciación. Un análisis de sobrerepresentación (ORA en sus siglas en inglés), realizado con la base de datos KEGG de vías de señalización, reveló un enriquecimiento en genes involucrados en las vías de señalización mediadas por proteínas localizadas en la membrana celular, incluyendo interacción con la matriz extracelular, moléculas de adhesión celular (MAC) y adhesión focal (Tabla 8).

Estos hallazgos resaltan el papel de las integrinas -entre otros mediadores de unión a la membrana- en la patogénesis tiroidea, similar a lo que ha sido ya descrito por otros grupos (Chudova, 2010). El análisis de sobrerepresentación también reveló enriquecimiento de las vías de señalización de cáncer en general, de cáncer microcítico de pulmón y de TGF $\beta$ , destacando el papel de estas vías canónicas en el carcinoma tiroideo.

Nombre de la vía	Vías de señalización		P-Valor corregido sobre FDR
	Genes diferencialmente expresados	Total de genes	
Interacción receptor MEC	19	85	3,32E-06
Moléculas de adhesión celular	18	133	1,09E-03
Adhesión focal	22	200	8,62E-03
Carcinoma microcítico de pulmón	12	85	2,60E-02
Vía de señalización TGF- $\beta$	11	84	4,70E-02
Lisosoma	13	121	5,60E-02
Vías en cáncer	26	326	7,05E-02
Ritmo circadiano	5	22	7,05E-02
Transducción olfatoria	1	388	1,00E+00

**Tabla 8-. Análisis de sobrerepresentación realizado con la base de datos KEGG de vías de señalización de los 910 genes desregulados significativamente en CPT.** El análisis reveló un enriquecimiento en genes involucrados en las vías de señalización mediadas por proteínas localizadas en la membrana celular como interacción con la matriz extracelular, moléculas de adhesión celular (MAC) y adhesión focal

### 1.2.1 Identificación de una red reguladora de miRs sobreexpresados involucrada en procesos biológicos esenciales como la diferenciación tiroidea

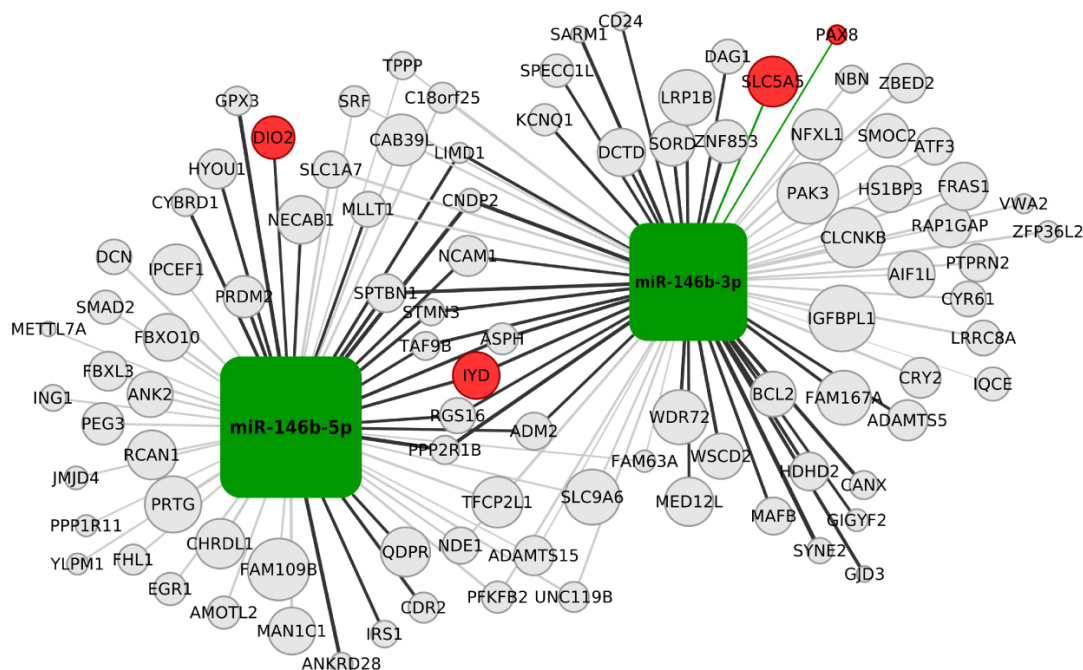
Se ha demostrado cómo un único miR hace diana en múltiples mRNA para regular su expresión. Inversamente, la expresión de un único gen es normalmente regulada por varios miRs. Así, la generación de redes de regulación involucrando miRs y genes se cree que afecta a funciones celulares esenciales.

Para identificar los genes diana de los miRs sobreexpresados en CPT utilizamos el programa computacional predictor de dianas TargetScan y buscamos secuencias diana en los 374 genes infraexpresados. De ellos, 217 genes resultaron ser presuntas dianas de los miRs sobreexpresados en CPT. Además de tener sitios de unión en los 3'UTR de sus presuntas dianas, la expresión de esos 12 miRs está inversamente correlacionada con la expresión de sus dianas predichas ( $FDR < 0.05$ , basado en un modelo de regresión lineal).

Como resultado, identificamos una red regulatoria de miRs y genes (Fig. 19) que revela nuevos genes candidatos para participar en la carcinogénesis tiroidea. También evidencia que algunos de los genes esenciales para la diferenciación tiroidea están bajo la influencia de esta red (Fig. 19 círculos en rojo). Los tres miRs con un mayor número de dianas en la red fueron miR-182, miR-146b-3p y miR-34a (regulando 71, 66 y 65 dianas, respectivamente). El análisis de la red también indica que los genes que están sujetos a una extensa regulación por miRs, identificados como nodos o *hubs*, son más propensos a resultar biológicamente relevantes (Liang, 2007; Budd, 2012). Además, se ha



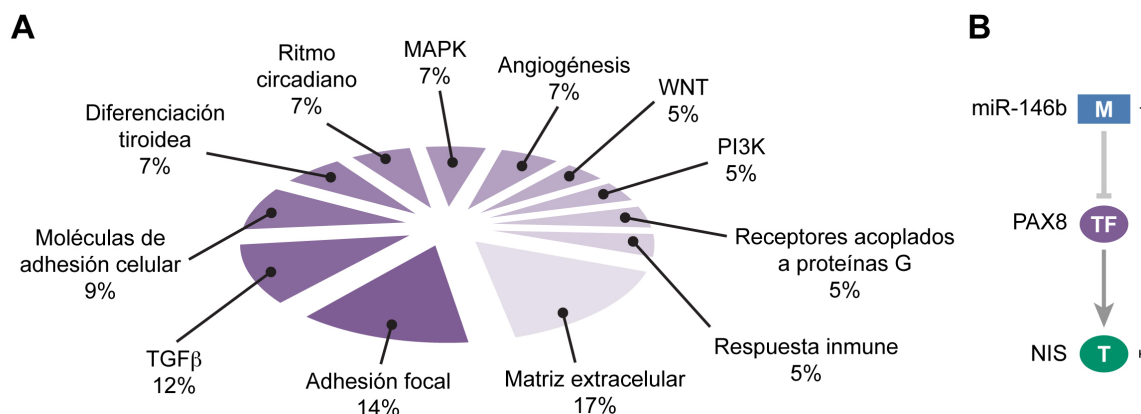
Al ser los miR-146b-5p y miR-146b-3p los dos miRs abundantes más sobreexpresados en CPT, decidimos centrar nuestros estudios en estas dos hebras maduras procedentes del mismo pre-mir. Encontramos que miR-146b-5p y miR-146b-3p regulan presuntamente a 54 y 66 genes de la red respectivamente, siendo 22 de ellos regulados por ambas hebras (Fig. 20). La mayor parte de los presuntos genes diana están relacionados con la interacción con la matriz extracelular, moléculas de adhesión celular y adhesión focal (Fig. 21A).



**Fig. 20.- Conjunto de dianas del miR-146b-5p y miR-146b-3p.** Esta red regulatoria involucra a 76 genes y consta de 98 interacciones miR:gen. Las líneas negras indican una correlación inversa, las grises señalan una presunta regulación y las verdes representan interacciones validadas experimentalmente. El grosor de la línea es proporcional al coeficiente de correlación y el tamaño del nodo es proporcional al nivel de cambio. En rojo se muestran genes involucrados en el metabolismo del yodo y el factor de transcripción tiroideo PAX8

Además, es importante resaltar que el miR-146b-3p hace presuntamente diana en dos genes esenciales para la diferenciación tiroidea: PAX8 y SLC5A5 (NIS) (Fig. 20, círculos en rojo). Además, miR-146b-5p también hace diana en la yodotironina desyodasa DIO2, que convierte la T4 en T3; y que tanto miR-146b-5p como miR-146b-3p regulan presuntamente a IYD (que codifica para la proteína conocida como DEHAL1) la yodotironina desyodasa que controla el reciclaje de yodo para la síntesis de hormonas tiroideas. Curiosamente, aunque el algoritmo de TargetScan, no lo reconoce como tal, múltiples algoritmos de predicción, incluyendo el algoritmo miRanda, predicen también la unión del miR-146b-3p a FOXE1.

En su conjunto, estos resultados desvelan las dianas de miR-146b-5p y miR-146b-3p en el CPT y dejan patente que los productos maduros del pre-mir-146b son reguladores clave de los genes involucrados en el metabolismo del yodo.



**Fig. 21-. Panel A: Funciones relacionadas con las dianas del miR-146b-5p y miR-146b-3p.** Diagrama de sectores representando la importancia de cada proceso biológico relacionado con el conjunto de dianas del miR-146b-3p y miR-146b-5p. **Panel B: Circuito de alimentación directa:** en el miR-146b-3p regula el FT PAX8 y su diana NIS.

Curiosamente, tanto SLC5A5 (NIS) y FOXE1 como IYD (DEHAL1) y DIO2 están descritos como dianas del factor de transcripción PAX8 (Ruiz-Llorente S, 2012, Di Palma T, 2011 y resultados propios no publicados). Por lo tanto, según las predicciones bioinformáticas, el pre-mir-146b regularía tanto al factor de transcripción (PAX8) como a sus dianas transcripcionales (NIS, FOXE1, IYD y DIO2), sugiriendo que el precursor mir-146b participa en un bucle de alimentación directa o *feedforward loop* que controla la expresión génica a través de un mecanismo directo o indirecto (Fig. 21B).

Adicionalmente, quisimos ampliar nuestro análisis a otros miRs involucrados en la diferenciación tiroidea. Gracias al algoritmo TargetScan, encontramos que un grupo de once miRs sobreexpresados tienen hipotéticas dianas en genes esenciales para la diferenciación tiroidea (Tabla 9). Como hemos mencionado anteriormente, PAX8 está supuestamente modulado por 5 miRs (miR-146b-3p, miR-182, miR-221, miR-222, y let-7e). Sin embargo, algunos miRs infraexpresados, también hacen diana en PAX8, lo cual podría estar atenuando los efectos inhibitorios observados mediados por los miRs sobreexpresados.

Análisis de expresión diferencial				Predicciones de TargetScan		
Símbolo	Nivel de cambio	P-valor	FDR	miRNA	Regul.	Posición en 3'UTR
SLC5A5	0,21	4,02E-06	3,20E-04	hsa-miR-146b-3p	↑	"3 - 9 "
				hsa-miR-21	↑	"552 - 558"
				hsa-let-7e	↑	"1353 - 1359" "373 - 380"
PAX8	0,52	5,03E-04	1,40E-02	hsa-miR-146b-3p	↑	"765 - 771" "812 - 818"
				hsa-miR-182	↑	"1767 - 1773"
				hsa-miR-221	↑	"275 - 281"
				hsa-miR-222	↑	"275 - 281"
				hsa-miR-138	↓	"477 - 483" "901 - 907"
				hsa-miR-144	↓	"999 - 1006"
				hsa-miR-199b-5p	↓	"2092 - 2098"
FOXE1	0,43	3,21E-05	1,71E-03	hsa-miR-155	↑	"1323 - 1330"
TSHR	0,41	4,79E-03	7,01E-02	hsa-miR-34a	↑	"1346 - 1352"
				hsa-miR-138	↓	"205 - 211"
				hsa-miR-199b-5p	↓	"1374 - 1380"
IYD	0,243	2,69E-06	2,34E-04	hsa-miR-146b-5p	↑	
				hsa-miR-146b-3p	↑	
				hsa-miR-182	↑	
				hsa-miR-375	↑	
TG	0,35	1,70E-04	6,21E-03	hsa-miR-34a	↑	
				-		-
TPO	0,09	2,95E-07	3,81E-05	hsa-miR-100	↓	"111 - 117"
				hsa-miR-99a	↓	"111 - 117"
NKX2-1	1,48	NS	NS	hsa-miR-375	↑	"132 - 138"
DUOX1	1,66	NS	NS	hsa-miR-34a	↑	"23 - 29"
DUOX2	1,16	NS	NS	hsa-miR-31	↑	"942 - 948"
				hsa-miR-34a	↑	"754 - 760"
				hsa-miR-152	↓	"930 - 936"
DIO2	0,284	9,17E-06	6,33E-04	hsa-miR-146-5p	↑	"2862 - 2868"
				hsa-miR-182	↑	"2717 - 2723"

**Tabla 9-: Los miRs desregulados más abundantes en CPT hacen diana en genes esenciales para la diferenciación tiroidea.** Todos los genes implicados en la diferenciación tiroidea menos TG y TPO son dianas de miRs sobreexpresados en CPT.

Además, según las predicciones (MiRanda y TargetScan), NIS estaría modulado por los miRs: miR-146b-3p y miR-21-5p; FOXE1 por los miRs miR-146b-3p y miR-155; y TSHR por miR-34a, aunque otros miRs infraexpresados también estarían involucrados en su regulación. La TG no parece estar modulada por ningún miR desregulado en CPT.

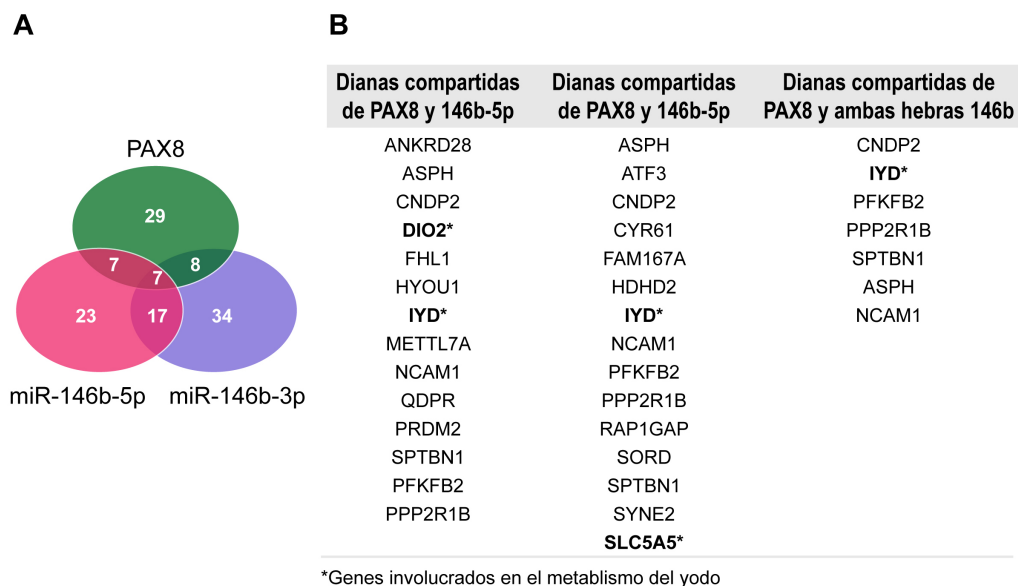


### 1.3.-PAX8 y miR-146b cooperan en la regulación de dianas comunes y se regulan mutuamente.

Tanto los miRs como los factores de transcripción ejercen un amplio efecto sobre la expresión génica. Se conoce la acción coordinada de miRs y FT para regular conjuntos de genes diana comunes a escala genómica a través de la existencia de una regulación recíproca entre ellos. Más concretamente, esa coordinación miR-FT forma pequeños circuitos regulatorios que constituyen exitosos mecanismos de expresión génica en un estadio o un tejido concreto.

Cómo ya hemos mencionado, observamos que las predicciones bioinformáticas identifican como dianas del miR-146b-3p tanto al factor de transcripción PAX8 como a sus dianas transcripcionales NIS y FOXE1. Además, observamos que en nuestra secuenciación masiva de mRNA, PAX8 estaba infraexpresado de manera significativa (nivel de cambio 0,52 con un p-valor <0.05) (Tabla 9).

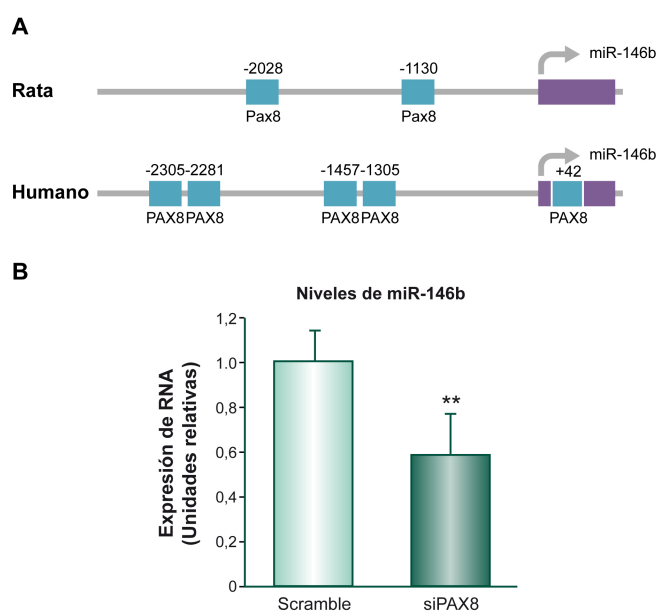
Por lo tanto quisimos explorar si el mir-146b y PAX8 compartían más genes diana de entre los obtenidos por secuenciación de las muestras tumorales. Para este propósito, usamos los datos procedentes de un análisis por ChIP-Seq de las dianas transcripcionales de PAX8 realizado previamente en nuestro laboratorio en la línea celular tiroidea de rata PCCI3 (Ruiz-Llorente, 2012). Integrando estos datos con nuestro análisis de secuenciación, obtuvimos una lista de 51 genes infraexpresados en CPT que eran dianas transcripcionales de PAX8. De esos 51 genes, 15 eran a la vez dianas del miR-146b-3p incluyendo NIS, FOXE1 y IYD, 14 lo eran también de del miR-146b-5p, y 7 lo eran de ambas (Fig. 22).



**Fig. 22.- PAX8 y el mir-146b cooperan la regulación de dianas compartidas. Panel A:.** Diagrama de Venn con la distribución de dianas comunes entre ambas hebras del mir-146b y PAX8 en CPT. **Panel B:** Lista de los genes regulados de manera común por PAX8 y cada una de las hebras del mir-146b. Los genes marcados con un asterisco indican genes involucrados en el metabolismo del yodo.

Así mismo, del análisis anterior de ChIP-Seq (Ruiz-Llorente, 2012) resultó muy interesante la observación de que el mir-146b es, a su vez, una diana transcripcional de PAX8 lo que parece indicar que ambos, factor de transcripción y mir-146b, se regulan mutuamente. Para explorar la posibilidad de que PAX8 regulase la expresión del mir-146b, buscamos presuntos sitios de unión de PAX8 en la región reguladora del mir-146b en la base de datos TRANSFAC de predicción de potenciales sitios de unión de FT (Fig.23A). Encontramos varias regiones de unión de PAX8 corriente arriba del inicio de la transcripción tanto en humanos como en rata (Ver Anexo I).

Para estudiar si existía una regulación funcional de la expresión del mir146b por PAX8 estudiamos el efecto del silenciamiento de Pax8 en la expresión del miR-146b transfectando siRNAs en células PCC13 (Fig.23B). Observamos una disminución en los niveles del miR-146b tras el silenciamiento de Pax8, indicando que este FT regula positivamente la transcripción del mir-146b.



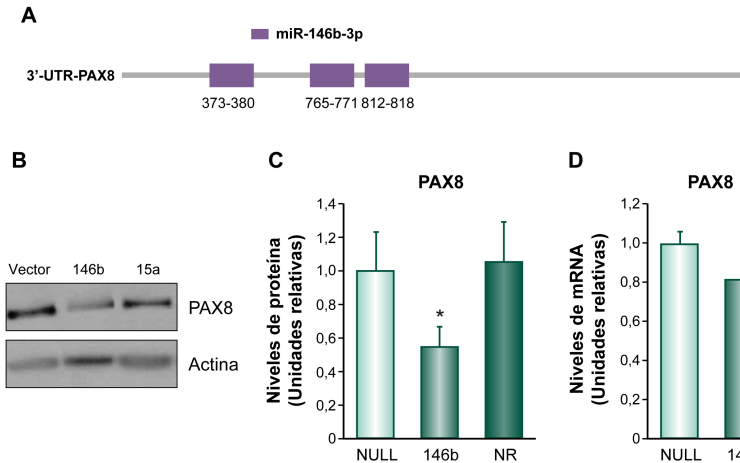
**Fig. 23-. PAX8 y el mir-146b se regulan mutuamente. Panel A:** Representación esquemática de la región reguladora del mir-146b mostrando los sitios de unión de PAX8 en el genoma humano y de rata. **Panel B:** Niveles de expresión del miR-146b analizados por qRT-PCR en células PCC13 silenciadas para Pax8 o su condición control (Scramble). U6 fue utilizado como normalizador.

Recíprocamente, para explorar si el mir-146b regula la expresión de PAX8, generamos las líneas celulares NThy-ori-mir-146b y su control NThy-ori-Null a partir del aislamiento de clones establemente transfectados con vectores de expresión del mir-146b y su control. La sobreexpresión de este precursor, que da lugar a ambos productos maduros, redujo los niveles endógenos de PAX8 tanto de proteína como de mRNA, aunque de ésta último no de manera significativa (Fig. 24).

Adicionalmente, al comprobar la existencia de tres sitios de unión para el miR-146b-3p en el extremo 3'UTR de PAX8 con el algoritmo computacional MiRanda, generamos un vector reportero clonando el extremo 3'UTR y otro con su misma secuencia en posición inversa como control negativo (Fig. 25B). La sobreexpresión del mir-146b en células HeLa indujo una reducción media



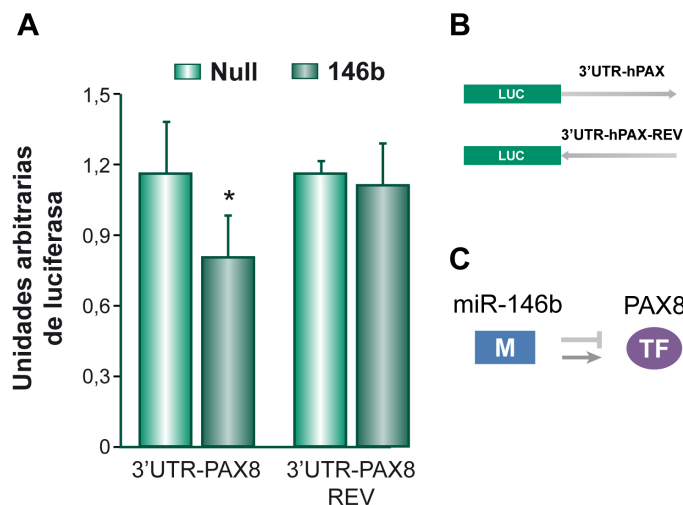
del 30% de la actividad luciferasa tras la cotransfección del vector que portaba el 3'UTR de PAX8 (Fig. 25A). Estos resultados demuestran que el miR-146b-3p reprime la expresión de PAX8 interaccionando de manera directa con su 3'UTR.



**Fig. 24.- El miR-146b reprime la expresión de PAX8. Panel A:** Representación esquemática del 3'UTR de PAX8 y los 3 sitios para el miR-146b-3p que alberga. **Panel B:** Ensayo de Western Blot representativo para PAX8 en NThy-ori-146b, la condición control NThy-ori-Null, y la línea no relacionada NThy-ori-15a. La  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga. **Panel C:** Diagrama de barras con la cuantificación de diferentes Western Blot mostrándose la inhibición media obtenida para los niveles proteicos de PAX8. La expresión de  $\beta$ -

Actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína cargada. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes. **Panel D:** Niveles de expresión de PAX8 analizados por qRT-PCR en células NThy-ori-146b y su condición control NThy-ori-Null. Los niveles de actina fueron utilizados como normalizador. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes.

Y, sobre todo, evidencia la existencia de un bucle de retroalimentación negativa que opera en la célula tiroidea, por el cual, el factor de transcripción PAX8 limita su propia actividad a través de la inducción de uno de sus represores, el miR-146b-3p (Fig. 25C).



**Fig. 25.- Panel A:** El miR-146b se une de manera directa al 3'UTR de PAX8. Actividad Luciferasa medida en células HeLa cotransfectadas transitoriamente con el 3'UTR de PAX8 en sentido directo o inverso (REV) junto al precursor pre-mir-146b o su condición control. **Panel B:** Representación esquemática del vector reportero utilizado en los ensayos de desestabilización de RNA. La región 3'UTR de PAX8 humano fue clonado a continuación de la Luciferasa en sentido directo y reverso. **Panel C:** Representación esquemática del circuito de retroalimentación negativa doble existente entre el miR-146b.

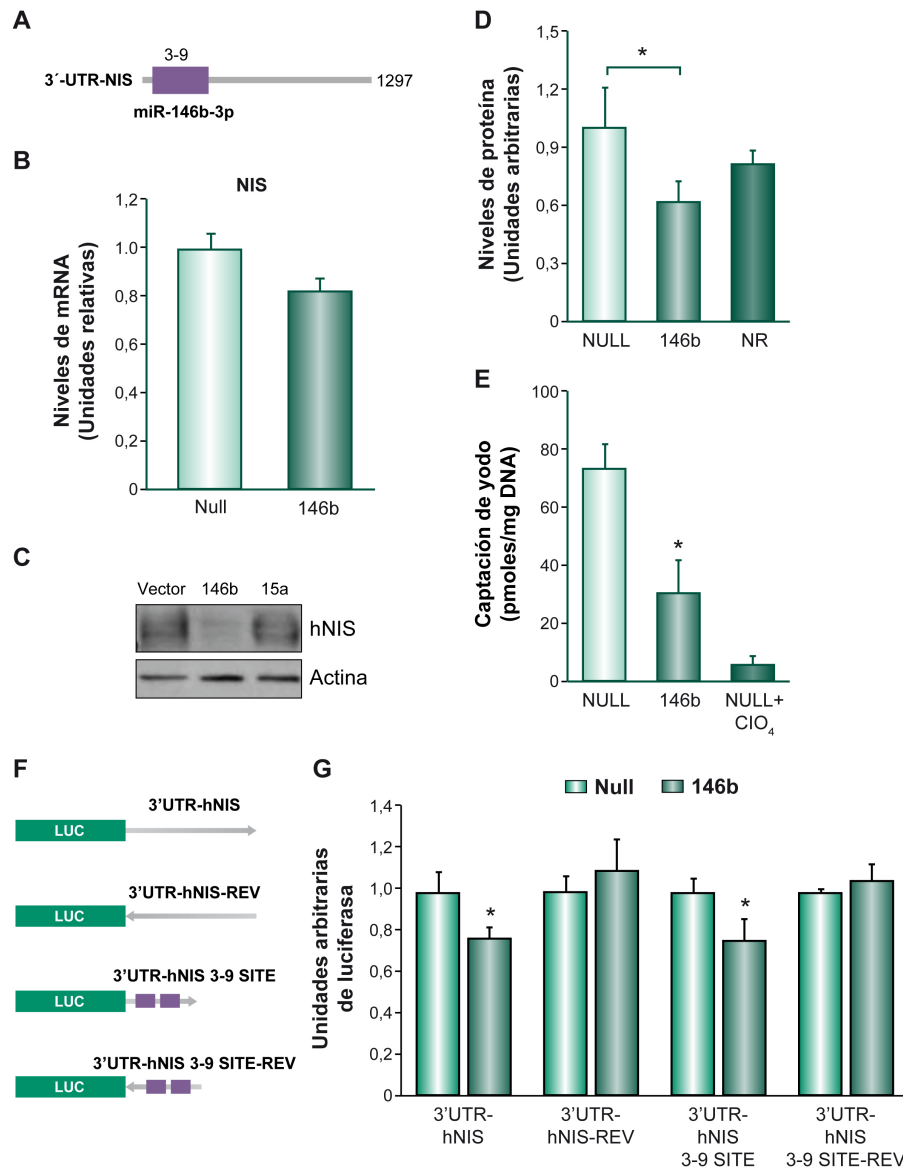
#### **1.4.-La expresión del miR-146b-3p disminuye la captación de yodo impidiendo la traducción de NIS a través de la interacción directa con su 3'UTR**

El algoritmo computacional MiRanda reveló la presencia de un sitio de unión para el miR-146b-3p en la posición 3-9 del extremo 3'UTR de NIS (Fig. 26A). Para verificar si el miR-146b-3p es capaz de inducir la represión de NIS, utilizamos la línea celular MDCKhNIS, que expresa NIS en la membrana celular mediando el transporte activo de yodo en el citoplasma (Zuckier, 2004).

De manera análoga a cómo hicimos con las células NThy-ori, generamos las líneas celulares MDCKhNIS-mir-146b y las MDCKhNIS-Null a partir del aislamiento de clones establemente transfectados con vectores de expresión del mir-146b y su condición control el vector pEGP-Null. Los ensayos de Western Blot y de RT-qPCR mostraron una reducción de los niveles de NIS de proteína (Fig. 26 C y D) y de mRNA aunque de ésta última no de manera significativa (Fig. 26B). Además, al realizar ensayos de captación de radioyodo, obtuvimos uno de los resultados más relevantes del trabajo: se produjo una reducción significativa en la captación de yodo mediada por NIS (Fig. 26E).

Estos resultados indican que el miR-146b-3p perjudica la traducción del mRNA de NIS reduciendo su expresión proteica y su actividad transportadora de yodo.

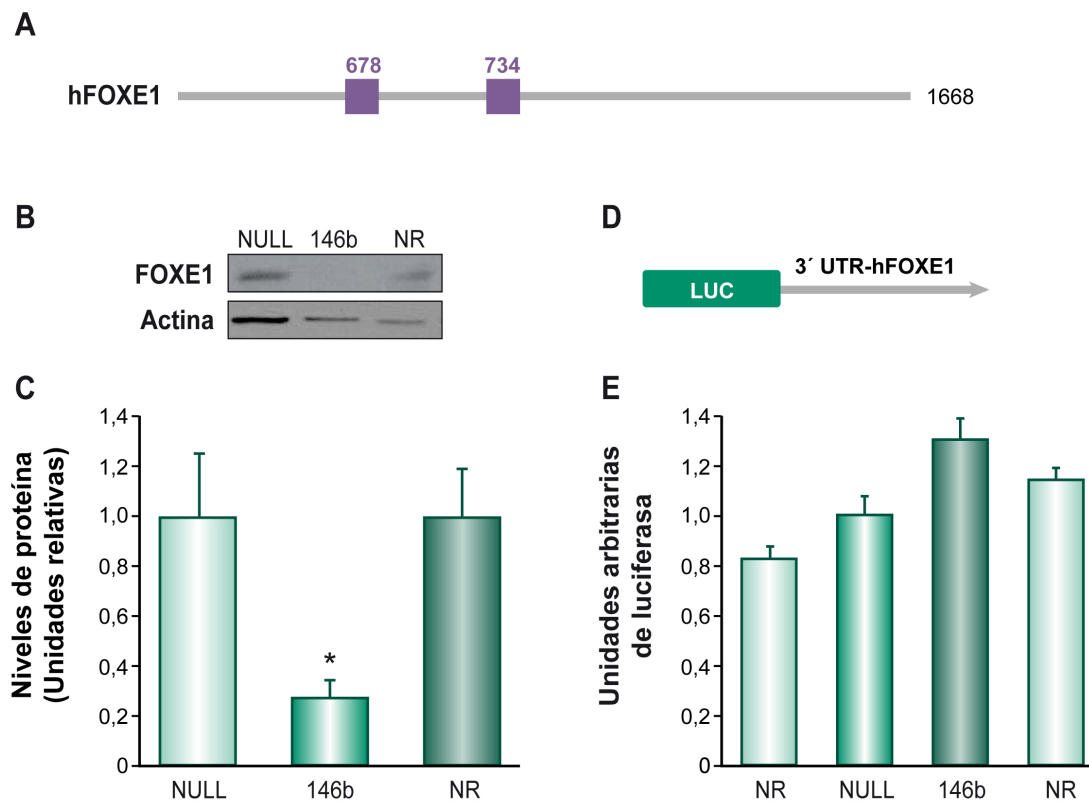
Posteriormente quisimos verificar la existencia de una interacción directa entre el miR y el extremo 3'UTR de NIS. El algoritmo computacional MiRanda reveló la presencia de un sitio de unión para el miR-146b-3p en la posición 3-9 del extremo 3'UTR de NIS (Fig. 26F). Para determinar su relevancia biológica generamos un vector reportero clonando el extremo 3'UTR y otro con 2 repeticiones interespaciadas en tándem de la pequeña región de 7 nucleótidos presentes en su presunto sitio de unión. Construcciones con su misma secuencia en posición inversa fueron generados y utilizados como controles negativos. La sobreexpresión del mir-146b en células HeLa se tradujo en una reducción media del 25% de la actividad luciferasa tanto tras la cotransfección del constructo que portaba el 3'UTR entero de NIS como el correspondiente a los segmentos 3-9 (Fig. 26G). Estos resultados demuestran que la disminución de la expresión de NIS causada por el miR-146b-3p está mediada por la presencia de la secuencia 3-9 en el 3'UTR con la que interaccionar.



**Fig. 26.- El miR-146b-3p reprime la expresión de NIS al unirse de manera directa a su 3'UTR.** Ensayos realizados en células MDCK-hNIS transfectadas establemente con el vector de expresión pEGP-mir conteniendo el precursor del mir-146b, otro mir no relacionado, o el vector control pEGP-Null. **Panel A:** NIS tiene un sitio de unión para el miR-146b-3p en la posición 3-9 de su 3'UTR. Representación esquemática de los sitios de unión en su 3'UTR. **Panel B:** Expresión relativa de los niveles de NIS analizados por qRT-PCR. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes. **Panel C:** Western Blot de la proteína NIS en extractos totales. La expresión  $\beta$ -Actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína cargada. **Panel D:** Diagrama de barras con la cuantificación de diferentes Western Blot mostrándose la inhibición media obtenida para los niveles proteicos de NIS. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes. **Panel E:** Ensayo de captación de yodo para determinar la función de NIS. El anión perclorato (ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>) fue usado como inhibidor competitivo de la captación de yodo mediada por NIS. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes. **Panel F:** Representación esquemática de los vectores reporteros utilizados en los ensayos de desestabilización de RNA. La región 3'UTR de NIS humano, conteniendo los sitios específicos de unión de miR146b-3p, fue clonada a continuación de la Luciferasa en sentido directo y reverso. **Panel G:** Actividad Luciferasa medida en células HeLa cotransfectadas transitoriamente con i) el 3'UTR de NIS en sentido directo o inverso (REV) o ii) 2 repeticiones en tándem de la pequeña región de 7 nucleótidos del unión el miR-146b-3p, junto al precursor pre-mir-146b o su condición control. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes.

### 1.5.- La sobreexpresión del mir-146b reduce la activación del promotor de NIS y reprime la expresión de FOXE1 de manera independiente de su 3'UTR

FOXE1 es un factor de transcripción tiroideo responsable del mantenimiento del fenotipo diferenciado y de la expresión de los demás factores específicos tiroideos. Aunque no todos los algoritmos de predicción los consideran significativos, según el algoritmo MiRanda posee dos putativos sitios de unión en las posiciones 678 y 734 de su 3'UTR para el miR-146b-3p (Fig. 27A). Este hecho nos llamó la atención, ya que los resultados del RNA-Seq realizados indican que está significativamente infraexpresado en CPT (nivel de expresión = 0,428; p-valor <0,001).

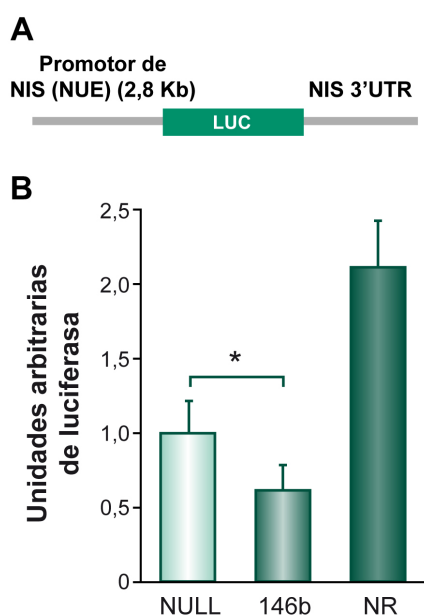


**Fig. 27.- La sobreexpresión del miR-146b-3p reduce la expresión de FOXE1 pero no se une de manera directa a su 3'UTR. Panel A:** FOXE1 tiene 2 sitios de unión para el miR-146b-3p en las posiciones 678 y 734 de su 3'UTR. Representación esquemática de los sitios de unión en su 3'UTR. **Panel B:** Western Blot de la proteína FOXE1 en extractos totales en células NThy-ori transfectadas establemente con el vector de expresión pEGP-mir conteniendo el precursor del mir-146b, otro mir no relacionado, o el vector control pEGP-Null. La expresión de  $\beta$ -Actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína cargada. **Panel C:** Diagrama de barras con los niveles medios de FOXE1. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes. **Panel D:** Representación esquemática de los vectores reporteros utilizados en los ensayos de desestabilización de RNA. La región 3'UTR de FOXE1 humano fue clonada a continuación de la Luciferasa en sentido directo y reverso. **Panel E:** Actividad Luciferasa medida en células HeLa cotransfectadas transitoriamente con el 3'UTR de FOXE1 en sentido directo o inverso (REV) junto al precursor pre-mir-146b o su condición control. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes.

Por ello, mediante Western Blot, determinamos los niveles proteicos de FOXE1 en nuestro sistema celular NThy-ori y NThy-ori-146b. Los resultados revelaron un silenciamiento significativo en los niveles proteicos de este factor de transcripción en presencia del mir-146b (Fig. 27 B y C).

Con el fin de verificar la existencia de un mecanismo represor directo del mir-146b sobre el 3'UTR de FOXE1, procedimos a clonar su 3'UTR corriente debajo de la luciferasa en el vector reportero pGL3 control (Fig. 27D). Sorprendentemente, la sobreexpresión en células HeLa del mir-146b no sólo no indujo la disminución de la actividad luciferasa en este constructo cómo cabía esperar, sino que produjo un ligero aumento en los valores de luciferasa (Fig. 27E). Estos resultados sugieren que la regulación de FOXE1 por parte del mir-146b puede estar mediada a través del silenciamiento de factores de transcripción involucrados en la expresión de FOXE1.

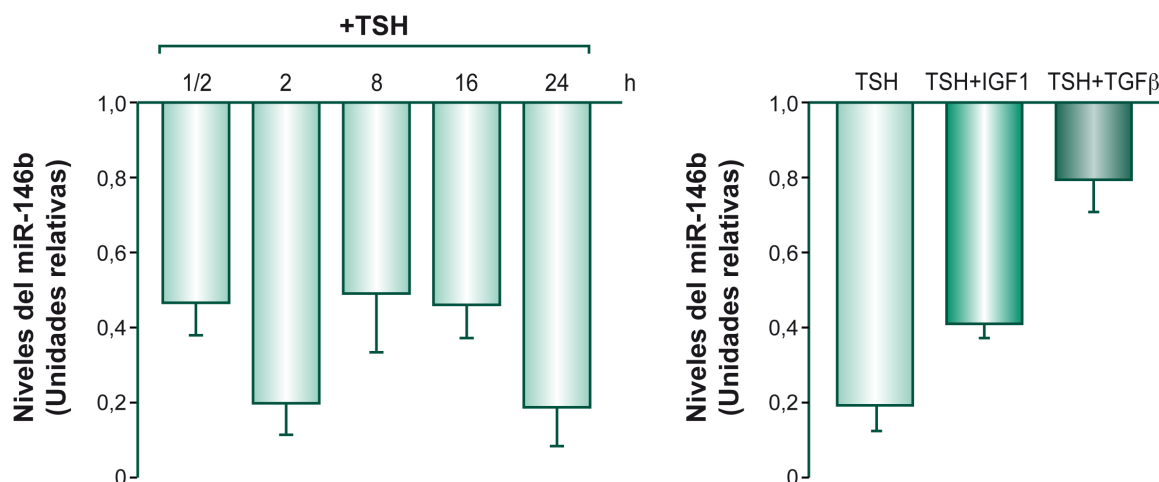
Para explorar algo más profundamente esta cuestión, y dado que los promotores de FOXE1 y NIS comparten varios factores de transcripción necesarios para su activación (Fernández, 2014), el promotor distal y el extremo 3'UTR de NIS fueron clonados corriente arriba y abajo de la luciferasa respectivamente en el vector reportero pGL3-basic (Fig. 28A). Células Nthy-ori fueron cotransfectadas transitoriamente con este constructo, la Renilla como normalizador y los vectores de expresión pEGP-mir conteniendo el precursor del mir-146b, otro mir no relacionado, y el vector control pEGP-Null. El análisis de la actividad Luciferasa desveló una inhibición media muy superior a la obtenida con el constructo que contenía exclusivamente la región 3'UTR de NIS, sugiriendo que existen al menos 2 mecanismos independientes por los que el mir-146b reprime la expresión de NIS: uno a un nivel postranscripcional a través de la unión directa a su 3'UTR; y otro mediante el silenciamiento de PAX8 y FOXE1, dos de sus principales factores de transcripción (Fig. 28B).



**Fig. 28-. Mir-146b también reprime la expresión de NIS por mecanismos indirectos: Panel A.** Representación esquemática del vector reportero conteniendo el promotor (NUE) y el 3'UTR de NIS. **Panel B.** Actividad Luciferasa medida en células NThy-ori cotransfectadas transitoriamente con el vector reportero pGL3-basic conteniendo el promotor distal (NUE) y el extremo 3'UTR de NIS clonados corriente arriba y abajo de la luciferasa respectivamente, junto al precursor pre-mir-146b o su condición control. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes.

### 1.6.- La expresión del miR-146b-3p es inhibida por TSH y recuperada por IGF1 y TGFβ

Dado el papel de miR-146b que acabamos de describir, también quisimos investigar cuál es su regulación hormonal en la célula tiroidea diferenciada. La TSH es la hormona esencial para que la célula tiroidea exprese los genes involucrados en la captación y el metabolismo del yodo y, por tanto, se diferencie completamente. Para explorar si la expresión del miR-146b estaba regulada por TSH, utilizamos la línea tiroidea de rata PCCl3. El tratamiento de las células con TSH indujo una fuerte represión de los niveles del RNA del miR-146b (Fig. 29 panel izquierdo). Este hecho tiene una gran relevancia biológica, ya que aquellos miRs involucrados en la desdiferenciación tiroidea deberían ser reprimidos por TSH en la célula folicular tiroidea normal. Además, esta represión se revirtió con el cotratamiento con IGF-1 y TGFβ, dos represores de la expresión de NIS inducida por TSH (Fig. 29 panel derecho). Así, estos datos indican que los niveles endógenos del miR-146b están sujetos a una fuerte regulación por TSH en la célula folicular tiroidea diferenciada.



**Fig. 29.- El miR-146b-3p está regulado por TSH, IGF1, TGFβ.** **Panel izquierdo:** Niveles de expresión del miR-146b analizados por qRT-PCR en células PCCl3 en presencia TSH en distintos puntos temporales. **Panel derecho:** Niveles de expresión del miR-146b analizados por qRT-PCR en células PCCl3 tratados con TSH o TSH e IGF1/TGFβ durante 2 horas. Los datos representan la media y la SD de un experimento representativo (n=3) de 3 experimentos independientes.



Por ello, nos preguntamos si los miRNAs desregulados en cáncer de tiroides e identificados en nuestro ensayo de miRNA-Seq podían estar contribuyendo en este proceso de hiperactivación. Con el fin de realizar una primera comprobación de la plausibilidad de esta hipótesis, realizamos un estudio bioinformático para determinar cuáles de los miRNAs desregulados tenían como presuntas dianas a componentes pertenecientes a la vía PI3K.

Gracias al algoritmo miRanda, elaboramos un mapa con la hipotética regulación de la vía PI3K (Fig. 30). Los resultados de este análisis indican que la vía PI3K está sujeta a una regulación muy específica por parte de los miRNAs desregulados, en la que los efectores positivos de la vía, que induce proliferación, supervivencia y migración, están sujetos a la presión de los miRs más infraexpresados, mientras que los supresores de la vía o los efectores afectados negativamente por ella, están mayoritariamente regulados por miRs sobreexpresados en CPT.

## 2.2. Influencia del miR-146b en la progresión tumoral a través de la modulación de la vía PI3K en la célula tiroidea

Entre los miRs sobreexpresados, en este análisis realizado con el algoritmo MiRanda, nos llamó la atención la existencia de un sitio de unión del miR-146b-5p en el extremo 3'UTR del supresor tumoral PTEN con un alto valor predictivo (mirSVR score: -0,1494) (Fig. 31).

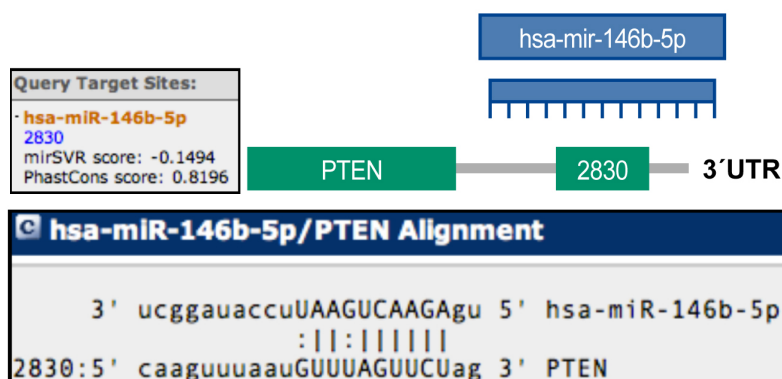


Fig. 31.- PTEN presenta un sitio de unión para el miR-146b en su 3'UTR. El algoritmo miRanda predice la unión del miR-146b-5p en la posición 2830 y le otorga un SVRscore significativo. Representación esquemática del 3'UTR de PTEN.

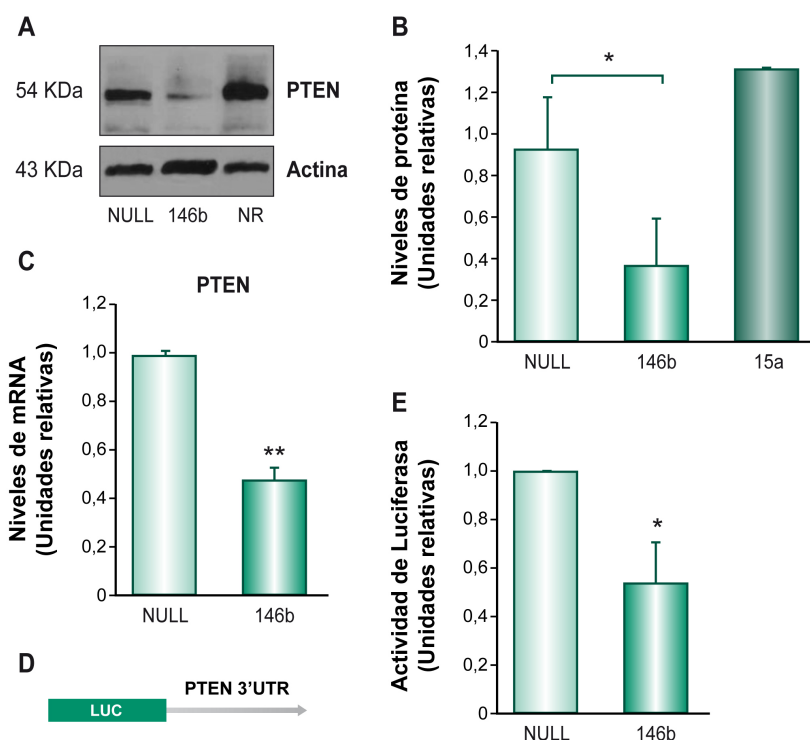
### 2.2.1.- PTEN es regulado directamente por el miR-146b-5p y sus niveles de expresión correlacionan inversamente en la célula folicular tiroidea

Para comprobar si el miR-146b-5p regula la expresión de PTEN, los niveles de la proteína y de mRNA de PTEN fueron analizados por Western Blot y por RT-qPCR respectivamente en las células NThy-ori-146b y en su control NThy-ori-Null. Los resultados mostraron una disminución



significativa en los niveles de PTEN, tanto en el mRNA como en proteína, en las células que sobreexpresaban el miRNA (Fig. 32 A y B).

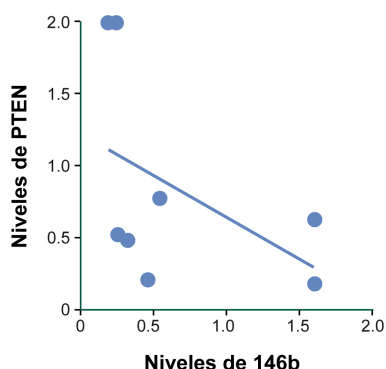
Posteriormente, para elucidar si la represión observada sobre PTEN era ejercida a través de la unión directa del miR-146b-5p a su región 3'UTR, se transfectó un vector reportero conteniendo la región 3'UTR de PTEN a continuación de la Luciferasa a células Nthy-ori y Nthy-ori-146b. Los ensayos con esta construcción demostraron que el miR-146b-5p inhibió de manera significativa la actividad Luciferasa del 3'UTR de PTEN en aproximadamente un 20% en relación al control, confirmando que PTEN es una diana directa de este miRNA (Fig. 32 D y E).



**Fig. 32.- El miR-146b-5p reprime la expresión de PTEN uniéndose de manera directa a su 3'UTR. Panel A:** Western Blot representativo para PTEN en Nthy-ori-146b, la condición control Nthy-ori-Null y la línea con el miR no relacionado NR (15a) con PTEN Nthy-ori-15a. La  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga. **Panel B:** Diagrama de barras con la inhibición media obtenida para los niveles proteicos de PTEN. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes. **Panel C:** Expresión relativa de los niveles de PTEN analizados por qRT-PCR. La expresión de actina se utilizó para normalizar. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes. **Panel D:** Representación esquemática del vector reportero utilizado en los ensayos de desestabilización de RNA. La región 3'UTR de PTEN humano está situado a continuación de la la Luciferasa en sentido directo y reverso. **Panel E:** Actividad Luciferasa medida en células HeLa cotransfectadas transitoriamente con el 3'UTR de PTEN. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes.

Para determinar el grado de relevancia biológica de esta represión, se determinaron los niveles de expresión del miR-146b, y los niveles proteicos de PTEN por RT-qPCR y Western Blot respectivamente en 8 líneas celulares tumorales humanas. En aquellas líneas celulares con altos

niveles de miR-146b se observaron bajos niveles proteicos de PTEN, mientras que las líneas con bajos niveles de este miR mostraron una alta expresión proteica de PTEN.



**Fig. 33.-. Los niveles de expresión del miR-146b y PTEN correlacionan inversamente en líneas celulares humanas.** Diagrama de dispersión mostrando la relación entre los niveles de PTEN medidos por Western Blot y los niveles de miR-146b evaluados por qRT-PCR. Las expresión de  $\beta$ -Actina y U6 se utilizaron para normalizar los niveles proteicos y de RNA respectivamente.

En el conjunto de las líneas celulares testadas, encontramos una correlación de  $r = -0,47$  entre miR-146b y PTEN (Fig. 33).

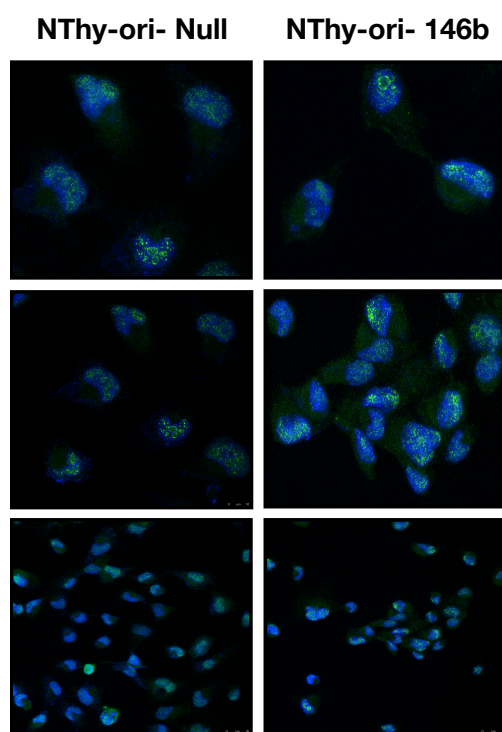
Estos resultados sugieren que la expresión del miR-146b está inversamente relacionada con PTEN en células de carcinoma tiroideo, y que la regulación ejercida por este miR sobre PTEN es relevante en este contexto biológico

## 2.2.2.- La sobreexpresión del miR-146b promueve la exclusión nuclear de FOXO1.

El factor de transcripción de la familia forkhead FOXO1 es una de las dianas de la vía PI3K. Está ampliamente expresado e involucrado en una gran variedad de procesos celulares como diferenciación, proliferación y apoptosis. La actividad transcripcional de FOXO1 está principalmente regulada a través de la modulación de su localización subcelular en respuesta a diferentes estímulos (Calnan 2008). Normalmente, los activadores de la vía PI3K, mediante la fosforilación de los residuos Thr-24, Ser-256 y Ser-319 de FOXO1 por parte de pAKT, inducen la translocación del núcleo al citoplasma de este factor, impidiendo su actividad transcripcional. Trabajos previos, realizados en nuestro laboratorio, demostraron que FOXO1 muestra una expresión elevada en tejido tiroideo humano control en comparación con tejido tumoral tiroideo y con líneas celulares derivadas de tumores tiroideos, en donde su expresión estaba fuertemente reprimida (Zaballos, 2011). Este trabajo demostró que el factor de crecimiento IGF1 regula la localización de FOXO1 promoviendo su exclusión nuclear de manera dependiente de AKT. También confirmó que p27 es una diana transcripcional de FOXO1 en la célula folicular tiroidea, así como que la reinducción de FOXO1 en células tumorales reduce su tasa de proliferación, mientras que su silenciamiento la incrementa.

Este vínculo, entre la pérdida de actividad de FOXO1 y la proliferación descontrolada de las células tumorales tiroideas, nos llevó a estudiar -dado el efecto inhibitorio de PTEN en la vía PI3K- el efecto de la expresión del miR-146b sobre la localización subcelular de FOXO1.

Para ello, realizamos ensayos de Inmunofluorescencia en los que fue analizada la localización de FOXO1 en las células NThy-ori y NThy-ori-146b. Los ensayos mostraron que en las células NThy-ori-Null -la condición control- FOXO1 se localizaba de manera exclusiva en el núcleo, mientras que aquellas que sobreexpresaban el miR-146b mostraron localización de FOXO1 en ambos compartimentos subcelulares (Fig. 34).



**Fig. 34.- El miR-146b promueve la exclusión nuclear de FOXO1.** Se determinó la localización subcelular de FOXO1 mediante inmunofluorescencia, utilizando un microscopio confocal con un objetivo de 63 aumentos. Se muestran las fotografías de un experimento representativo de 3 experimentos independientes, en las que se observa la inmunodetección de FOXO1 y su superposición con la tinción nuclear (DAPI).

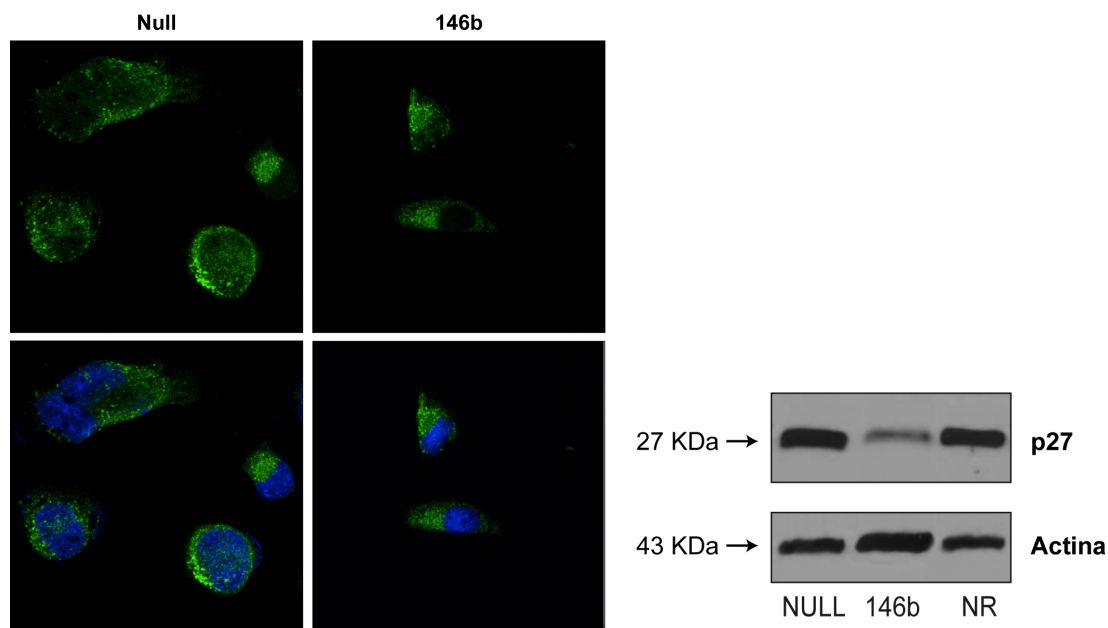
### **2.2.3.- La sobreexpresión del mir-146b induce la exclusión nuclear de p27 y reduce sus niveles totales.**

El supresor tumoral p27 es, al igual que FOXO1, es una proteína regulada principalmente por la actividad de la vía PI3K. La hiperactivación oncogénica de la vía PI3K, mediante la fosforilación por AKT, deslocaliza a este inhibidor de quinasas del núcleo al citoplasma (Viglietto, 2002; Larrea 2009).

La traslocación de p27 al citoplasma que tiene lugar en células tumorales, produce un incremento en la proliferación -mediante la falta de interacción y su consiguiente inhibición de la activación de los

complejos Ciclina E-CDK2 o Ciclina D-CDK4- y la motilidad -a través de la inhibición de la polimerización de los microtubulos mediada por el aumento de la Estatmina libre (Baladasarre, 2005). Adicionalmente, la demostración de que p27 es una importante diana transcripcional de FOXO1 en el trabajo anteriormente mencionado (Zaballos, 2011), junto con las observaciones descritas sobre la translocación de FOXO1 inducida por el miR-146b, sugerían la posibilidad de que los niveles totales de p27 se vieran también disminuidos.

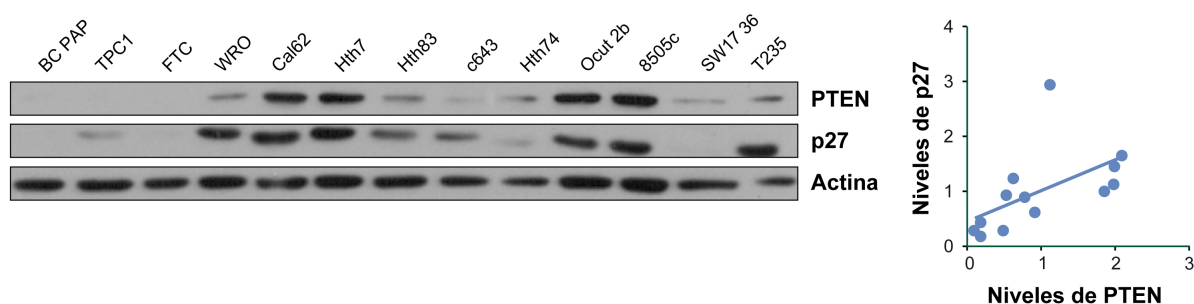
Para estudiar el efecto de la sobreexpresión del miR-146b sobre la regulación de p27 en la célula folicular tiroidea, se efectuaron ensayos de inmunofluorescencia sobre las líneas celulares NThy-ori-Null y NThy-ori-146b. Los resultados mostraron que, en presencia de altos niveles del miR-146b, se producían: i) cambios significativos en la localización de p27 causando el confinamiento citoplasmático de esta proteína, y ii) una reducción significativa en los niveles totales de p27 (Fig. 35 panel izquierdo). Además, este resultado fue confirmado mediante ensayos de Western Blot en extractos proteicos totales que confirmaron la reducción de p27 total desencadenada por el miR-146b observada por inmunofluorescencia (Fig. 35 panel derecho). En esta dirección, recientemente se ha demostrado una correlación entre altos niveles de miR-146b, metástasis a distancia y bajos niveles de mRNA de p27 en CPT (Acibucu, 2014).



**Fig. 35-. El mir-146b reduce los niveles de p27 e induce su exclusión nuclear. Panel izquierdo:** Se determinó la localización subcelular de p27 mediante inmunofluorescencia, utilizando un microscopio confocal con un objetivo de 63 aumentos. Se muestran las fotografías de un experimento representativo de 3 experimentos independientes en las que se observa la inmunodetección de p27 y su superposición con la tinción nuclear (DAPI). **Panel derecho:** Western Blot de la proteína p27 en extractos totales en células NThy-ori transfectadas establemente con el vector de expresión pEGP-mir conteniendo el precursor del mir-146b, otro mir no relacionado (NR), o el vector control pEGP-Null. La expresión de  $\beta$ -Actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína cargada.

Adicionalmente, se determinaron los niveles proteicos de PTEN y p27 por Western Blot en un panel de líneas celulares tumorales humanas (Fig. 26 panel izquierdo). Los resultados mostraron una significativa correlación entre los niveles de ambos supresores tumorales. Usando un análisis de regresión lineal, en el panel de líneas celulares tumorales tiroideas testadas encontramos una correlación inversa entre miR-146b y p27 de  $r = -0,55$  (Fig. 36 panel derecho).

Estos resultados apuntan a que la expresión del miR-146b está inversamente relacionada con p27 en células derivadas de todos los carcinomas tiroideos, y que la regulación ejercida por este miR sobre p27, efector negativamente regulado por la vía PI3K, es relevante en este contexto biológico.



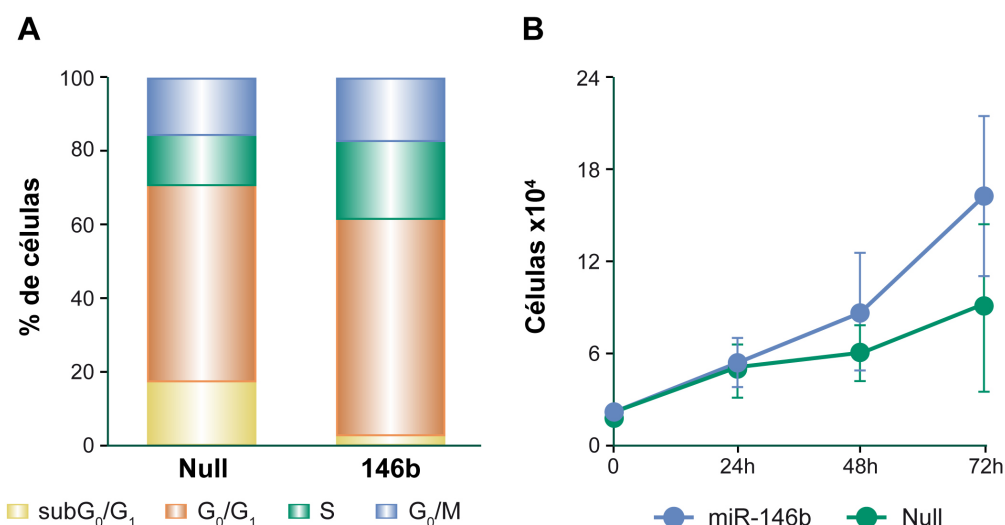
**Fig. 36.- La expresión de p27 está fuertemente relacionada con la expresión de PTEN en líneas celulares de cáncer de tiroides. Panel izquierdo:** Western Blot de las proteínas p27 y PTEN en extractos totales en un panel de líneas celulares tiroideas tumorales humanas. La expresión de  $\beta$ -Actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína cargada. **Panel derecho:** Diagrama de dispersión mostrando la relación entre los niveles de p27 y PTEN evaluados por Western Blot.

## 2.2.4.- El miR-146b induce proliferación desencadenando la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular.

En células tiroideas de rata, IGF1 induce la entrada en la fase S del ciclo celular, a través de la expresión de genes de ciclo celular, ciclinaD entre otros, y de la degradación del inhibidor de CDKs p27 (Pirson, 1996; Lewis, 2004; Fukushima, 2008). Por ello, las grandes diferencias en la cantidad y distribución de p27 observadas tras la sobreexpresión del mir-146b hizo plantearnos la hipótesis de si la hiperactivación de la vía PI3K, provocada por la sobreexpresión del mir-146b, también podía desencadenar este efecto sobre el proceso de transición del ciclo celular.

Este punto lo confirmamos en nuestro sistema experimental de células NThy-ori null y NThy-ori-146b con un ensayo de distribución del ciclo celular realizado por citometría de flujo. Los resultados mostraron un marcado aumento de las fases S y G2/M en aquellas células con una sobreexpresión constitutiva del mir-146b (Fig. 37A)

Para cuantificar el impacto de estos resultados sobre el crecimiento celular, se midió la tasa de proliferación en las dos condiciones mediante un ensayo de proliferación durante 72 horas con un contador automático de células. Los resultados mostraron un aumento en el número de células de alrededor de 2 veces (Fig. 37B).



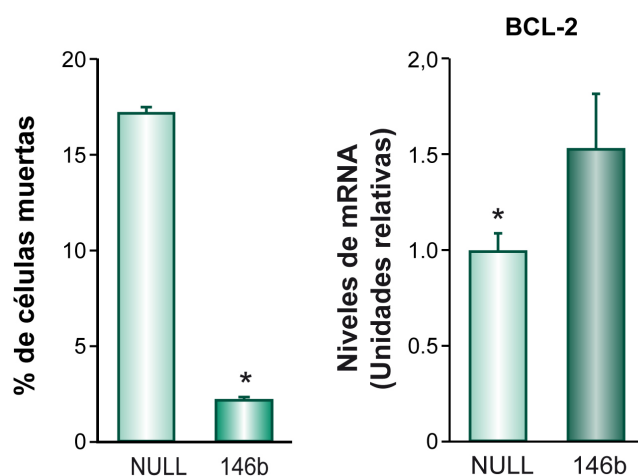
**Fig. 37.- El miR-146b promueve la transición G1 a S incrementando la proliferación. Panel A:** Análisis de distribución del ciclo celular realizado con yoduro de propidio por citometría de flujo. Los datos representan la media de un experimento representativo de 2 experimentos independientes. **Panel B:** Ensayo de proliferación efectuado con un contador automático de células NThy-ori-146b y su condición control NThy-ori-Null. Los datos representan la media y la SD de un ensayo representativo (n=3) de 3 experimentos independientes.

## 2.2.5.- El miR-146b aumenta la supervivencia mediante la sobreexpresión de BCL-2 en la célula folicular tiroidea.

Adicionalmente se calculó la proporción de células muertas a través de la cuantificación de la fase subG0 del ensayo de ciclo celular anteriormente descrito. El análisis de citometría de flujo reveló una disminución significativa de la muerte celular en presencia del mir-146b (Fig. 38 panel izquierdo). Estos datos sugerían la activación de algún mecanismo antiapoptótico desencadenado por la vía PI3K.

Numerosos mecanismos antiapoptóticos mediados por la vía PI3K han sido descritos, bien por la inactivación de proteínas proapoptóticas como BAD, BCL-2, caspasa-9, factores de transcripción de la familia Forkhead; o bien por la activación de proteínas antiapoptóticas como NF- $\kappa$ B o CREB (Cardone, 1998; Brunet, 1999; Masuyama, 2001; Romashkova, 1999; Kane, 1999; Du, 1998).

La actividad del factor antiapoptótico BCL-2 ha sido descrita como regulada por la vía PI3K mediante al menos 3 mecanismos moleculares diferentes: a través de las fosforilaciones inactivadoras de las proteínas proapoptóticas BAD y BIM, y a través de la fosforilación de MDM2 en las serinas 166 y 188, que cursa con un incremento en su actividad ubiquitín ligasa y la degradación de p53. El RNA-Seq llevado a cabo en nuestro laboratorio con 8 tumores desveló un aumento medio significativo en los niveles de MDM2 de 2,56 veces en los CPT en comparación con su tejido normal adyacente. Sin embargo, los resultados del trabajo de TCGA (TCGA, 2014) indican que aquellos carcinomas papilares con una activación de la vía PI3K -principalmente aquellos con mutaciones en RAS o con BRAF K601E- presentan elevados niveles de BCL-2 mediados por un aumento en los niveles pBAD (pS112).



**Fig. 38.- El miR-146b aumenta la supervivencia celular mediante la sobreexpresión de BCL-2.** **Panel izquierdo:** Diagrama de barras representando el porcentaje de células pertenecientes a la población subG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> sobre el total, en un análisis de distribución del ciclo celular realizado con yoduro de propidio por citometría de flujo. Los datos representan la media y la SD de un experimento representativo (n=3, de mediciones secuenciales de la misma población) de 3 experimentos independientes. **Panel derecho:** Expresión relativa de los niveles de mRNA de BCL-2 analizados por RT-qPCR. La expresión de  $\beta$ -Actina se utilizó para normalizar. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes

Por ello, decidimos cuantificar los niveles de mRNA de BCL-2 en las células NThy-ori-null y NThy-ori-146b. El incremento de los niveles del mir-146b aumentó de forma significativa los niveles de BCL-2 medidos por RT-qPCR (Fig. 38 panel derecho).

Estos datos sugieren que BCL-2 participa en la inducción de la supervivencia desencadenada por la sobreexpresión del mir-146b.

### 2.3.- Función del eje LIN28B/miR-30a en la progresión tumoral a través de la modulación de la vía PI3K en la célula tiroidea.

De igual manera, de entre los miRs infraexpresados nos llamó poderosamente la atención la existencia putativa de dianas de alto valor predictivo para el miR-30a en la oncoproteína LIN28B, así como para la mayoría de los efectores de la vía: RAS, PI3K, mTOR, S6K, MDM2, NF $\kappa$ B, BCL-2,

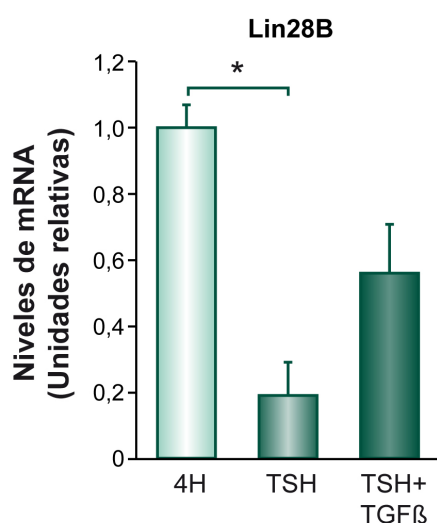
CDK6 y E2F3; sugiriendo que este mir también puede jugar un papel importante en la regulación de la vía.

### 2.3.1.- La expresión de LIN28B es reprimida durante diferenciación inducida por TSH en la célula folicular tiroidea

En primer lugar quisimos investigar cuál es la regulación hormonal de Lin28B y determinar su perfil de expresión durante la diferenciación tiroidea. Como hemos mencionado anteriormente, la TSH es la hormona esencial para que la célula tiroidea se diferencie completamente, y es la responsable de la expresión de los factores de transcripción que controlan la expresión de los genes tiroideos involucrados en la síntesis de hormonas tiroideas.

Para determinar si la expresión de Lin28B estaba regulada por TSH, utilizamos la línea tiroidea de rata PCC13. En ausencia de TSH se observan niveles normales de expresión de Lin28B, niveles que se ven disminuidos a un 80% cuando las células son tratadas con TSH (Fig. 39).

Esto concuerda con lo descrito en otros tejidos y es un indicio preliminar de que Lin28B puede ser un agente implicado en el proceso de diferenciación tiroidea (Piskounova, 2011)



**Fig. 39.- Regulación hormonal de Lin28B.** Niveles de expresión del Lin28B analizados por qRT-PCR en células PCC13 tratadas con TSH o TSH y TGFβ durante 5 horas. Los niveles de Actina fueron utilizados como normalizadores de la expresión. La expresión de actina se utilizó para normalizar. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes.

Adicionalmente, el cotratamiento con TGFβ -un factor clave en la pérdida del estado diferenciado y en el aumento de malignidad en las neoplasias tiroideas (Riesco-Eizaguirre 2009)- rescató parcialmente a Lin28B de la represión inducida por TSH (Fig. 39).

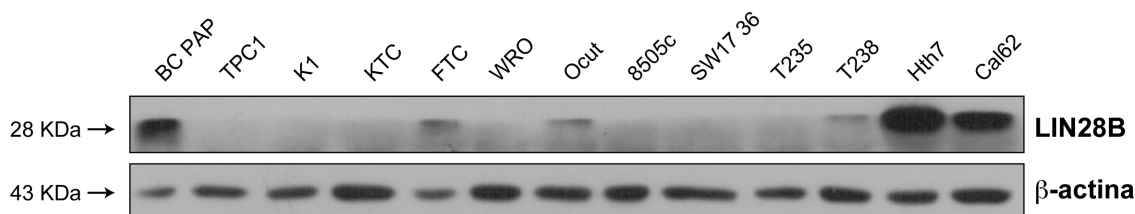
Estos datos indican que la expresión endógena de Lin28B está sujeta a una fuerte regulación por TSH y por otro de los factores reguladores de la función tiroidea en la célula diferenciada.



### 2.3.2.- La proteína oncofetal LIN28B presenta una expresión aberrante en los carcinomas tiroideos con hiperactivación de la vía PI3K

Para llevar a cabo un análisis inicial de la importancia de LIN28B en el contexto de la patología tumoral tiroidea, determinamos sus niveles de mRNA y de proteína en 15 líneas celulares tiroideas clasificadas por su mutación conductora y por el tipo de cáncer del que provienen (Fig. 40). Así de las 15 líneas testadas, 6 de ellas (40%) -BCPAP, FTC-133, OCUT2, Hth7, T238 y Cal62- expresaron una cantidad significativa de LIN28B tanto a nivel de proteína como de RNA. De las líneas positivas para LIN28B, 4 de ellas provenían de CAT, una de CFT y una de CPT, y todas albergaban mutaciones hiperactivadoras de la vía PI3K como ganancias de copias de AKT (BCPAP y Hth7), delecciones en PTEN (FTC-133), activación constitutiva de la subunidad catalítica alfa de la PI3K (PI3KCA) (Ocut2 y T238), o la activación constitutiva de RAS (Hth7 y Cal62). Curiosamente, la línea celular que presentó, con gran diferencia, una expresión más exacerbada de LIN28B fue Hth7, que es precisamente la única en portar dos mutaciones hiperactivadoras de la vía PI3K: ganancia de copias de AKT y RAS mutado.

Por el contrario, de las 9 líneas restantes que no mostraron expresión de LIN28B (Nthy-ori, TPC-1, K1, KTC-1, WRO, SW1736, T235, H74 y 8505c) 8 de ellas (89%) no albergan ninguna mutación hiperactivadora de la vía PI3K (albergan mayoritariamente mutaciones en BRAF o en p53 y reordenamientos RET/PTC). Sólo la línea celular K-1, que alberga una mutación en PI3KCA, no se agrupa en esta clasificación dual al no presentar niveles detectables de LIN28B proteica.

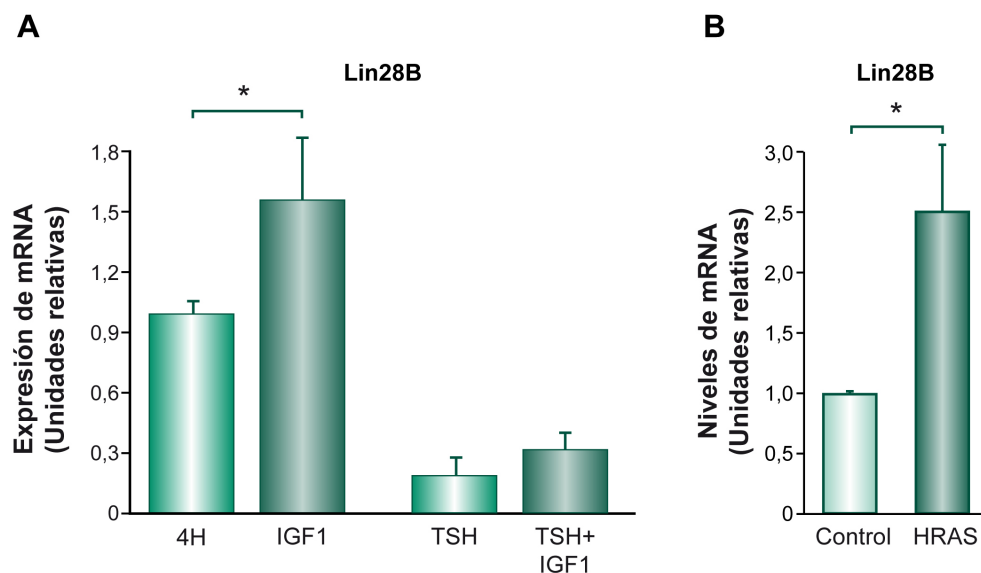


**Fig. 40.- La expresión de LIN28B está relacionada con mutaciones activadoras de la vía PI3K en líneas celulares de cáncer de tiroides:** Western Blot de la proteína LIN28B en extractos totales en un panel de líneas celulares tiroideas tumorales humanas. La expresión de β-Actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína cargada.

La abundancia relativa del mRNA de LIN28B en cada línea celular fue analizada por RT-qPCR. El patrón de expresión de mRNA fue coincidente con el de proteína (datos no mostrados). Tras este hallazgo, quisimos explorar el papel de la asociación de LIN28B con la vía PI3K. Para ello analizamos los niveles de expresión de Lin28b en las células PCCI3 y en las mismas células sobreexpresando de manera condicional el oncogén Ras, bajo el control de Doxicilina.

La adición de IGF1, principal activador de la vía PI3K cursó con un aumento de al menos 1,5 veces en los niveles de mRNA de Lin28B, tanto en las células quiescentes desdiferenciadas mantenidas en 4H como en aquellas diferenciadas mantenidas en presencia de TSH, aunque en este último caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 41 panel A).

De manera similar, en las células PCCl3 con expresión de Ras inducible por Doxiciplina, el tratamiento con este antibiótico incrementó los niveles de mRNA de Lin28B al doble con respecto a las no tratadas (Fig. 41 panel derecho).



**Fig. 41.- La presencia de IGF1 y la sobreexpresión de RAS inducen la expresión de Lin28B.** Niveles de expresión del Lin28B analizados por qRT-PCR en células PCCl3. **Panel A:** tratadas con IGF1, TSH o TSH más IGF1 durante 5 horas. **Panel B:** tratadas con doxiciplina, durante 24 horas, para inducir condicionalmente la activación de de HRAS. Los niveles de Actina fueron utilizados como normalizadores de la expresión en ambos ensayos.

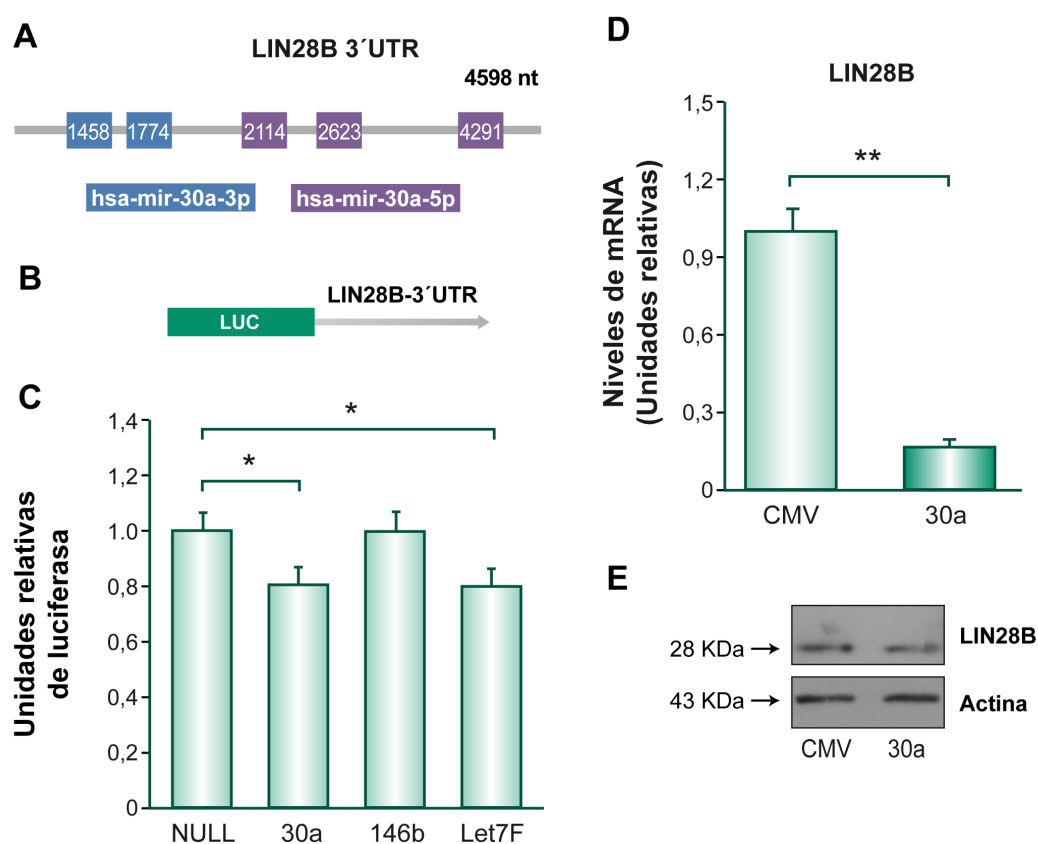
Estos datos indican que la hiperactivación tumoral de la vía PI3K rescata los niveles de Lin28B de la represión ejercida por a TSH en la célula tiroidea diferenciada.

### 2.3.3.- Mir-30a desestabiliza el mRNA de LIN28B uniéndose de manera directa a su 3'UTR inhibiendo su expresión proteica

Un análisis computacional con el algoritmo MiRanda desveló la existencia -muy inusual- de un total de 5 sitios de unión ampliamente conservados en el extremo 3'UTR de LIN28B para el mir-30a, situados en las posiciones 1458 y 1774 para el miR-30a-3p, y en las posiciones 2114, 2623 y 4291 para el miR-30a-5p (Fig. 42A)

La suma de las puntuaciones mirSVR -algoritmo para predecir la probabilidad e intensidad de una determinada inhibición- obtenidas para la presunta represión de LIN28B por parte del mir-30a fue

igual a -1,3, lo que según la estimación del algoritmo, equivale a una represión media del 90% (Betel, 2010). Esta puntuación (mirSVR total = 1,3) es superior a la de la familia Let-7, los reguladores canónicos de LIN28B; y sólo es superada por el mir-374b, un miRNA no pertenecientes al miRNoma tiroideo (esto es, indetectable en el contexto tiroideo normal o patológico). Esto convierte al mir-30a, infraexpresado de manera más intensa según avanza la progresión tumoral (Schwertheim, 2009; Baffa, 2009; Exposito, 2012), en el candidato más relevante biológicamente para regular la expresión de LIN28B. Para verificar si LIN28B es realmente una diana directa del miR-30a utilizamos el vector reportero psiCheck2-Lin28B3'UTR, específico para ensayos de desestabilización de RNA mensajero (Fig. 42B)



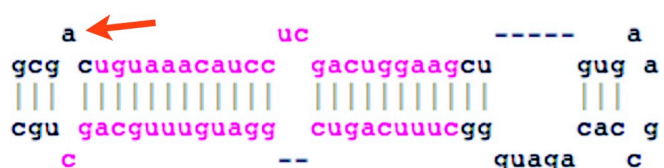
**Fig. 42-. Mir-30a desestabiliza el mRNA de LIN28B a través de la interacción con su 3'UTR. Panel A:** Representación esquemática del 3'UTR de LIN28B y los 5 sitios para ambas hebras del miR-30a que alberga. **Panel B:** Representación esquemática del vector reportero psiCheck2 conteniendo el 3'UTR de LIN28B clonado a continuación de la Luciferasa utilizado en los ensayos de estabilidad del RNA. **Panel C:** Actividad Luciferasa medida en células HeLa cotransfectadas transitoriamente con el 3'UTR de LIN28B, junto al precursor del mir-30a, mir-146b, Let-7F o su vector control pEGP-Null. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes. **Panel D:** Expresión relativa de los niveles de mRNA de LIN28B analizados por qRT-PCR en células Cal62. La expresión de  $\beta$ -Actina se utilizó para normalizar. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes. **Panel E:** Western Blot de la proteína LIN28B en extractos totales de células Cal62. La expresión de  $\beta$ -Actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína cargada. Imagen representativa de 3 ensayos independientes.

Los ensayos de luciferasa realizados mostraron que la cotransfección de este vector junto con el precursor del mir-30a redujo los niveles de Luciferasa en un 20% comparado tanto con la condición control como con un mir no relacionado (mir-146b). Esta reducción fue igual a la presentada por el precursor del mir Let-7f, descrito como un potente represor de LIN28B (Fig. 42C).

Para profundizar en el estudio de la regulación de LIN28B en los carcinomas tiroideos se seleccionó la línea celular Cal62 ya que presentaba una expresión intermedia tanto de esta proteína como del mir-30a con respecto a otras líneas tumorales. La transfección del precursor del mir-30a en esta línea celular produjo una disminución significativa de los niveles de mRNA (Fig. 42D) y proteína (Fig. 42E) de LIN28B. Estos datos confirman que LIN28B está regulado de manera directa por mir-30a.

#### 2.3.4.- Mir-30a y LIN28B se reprimen recíprocamente conformando un circuito de retroalimentación negativa bidireccional

El estudio de la estructura secundaria del precursor del mir-30a reveló la presencia de una adenina protuberante no apareada rodeada por 2 bases de guanina y citosina apareadas (Fig. 43). Este motivo específico ha sido descrito como un determinante de unión de LIN28 al RNA (Lei, 2012). Esta observación nos hizo plantearnos la posibilidad de que la interacción predicha conllevara -como en el caso de la familia Let- el secuestro del pri- o el pre-mir-30a en los nucleolos, fuera del alcance del microprocesador o de la Exportina 5, bloqueando su procesamiento o su correcta compartimentalización.

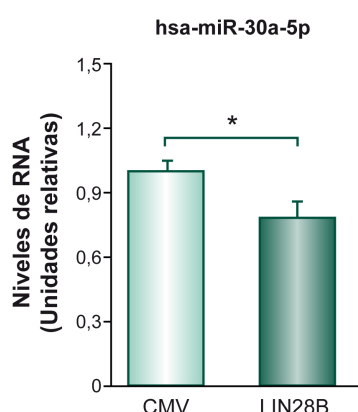


**Fig. 43.- La estructura secundaria del mir-30a presenta un motivo de unión de LIN28B al RNA.** Representación esquemática del precursor mir-30a. La flecha roja indica el determinante de unión consistente en una A protuberante no apareada rodeada por 2 bases G y C apareadas. La secuencia marcada en rosa corresponde a las hebras maduras

Para verificar si LIN28B es capaz de inducir la represión del mir-30a realizamos estudios de ganancia de función, utilizamos la línea celular 8505c ya que tiene una expresión endógena de LIN28B prácticamente indetectable. A las 48 horas de la transfección, observamos una disminución significativa de los niveles de miR-30a-5p en las células que sobreexpresaban LIN28B con respecto a la condición control (Fig. 44).

Estos datos indican que la proteína de unión a RNA LIN28B es capaz de reducir la expresión del mir-30a por un mecanismo aún no elucidado. Al ser esta represión bidireccional y al tener estos dos elementos una expresión mutuamente exclusiva, en la que el elemento preponderante va siendo

alternado en los estados desarrollo/diferenciación y fisiológico/patológico, se podría afirmar que



Lin28B forma con el mir-30a un eje similar al que forma con la familia Let-7.

**Fig. 44.- LIN28B reduce la expresión del miR-30a.** Expresión relativa de los niveles de RNA de LIN28B analizados por qRT-PCR. La expresión de U6 se utilizó para normalizar. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes.

### 2.3.5.- El eje LIN28B/mir-30a regula la activación de la vía PI3K en cáncer de tiroides

Varios grupos han demostrado que LIN28B incrementa la activación de la vía PI3K en tejido muscular y en cáncer de cabeza y cuello (Zhu, 2011; Alajez, 2012). Se describió que este fenómeno era debido: i) a la desrepresión de múltiples dianas directas de Let-7 en esta vía (como IGF1R, IRS2, PIK3IP1 o AKT2) (Zhu, 2011), y ii) a los mecanismos de estabilización del mRNA y reclutamiento de cofactores que estimulan su traducción (Lei, 2012).

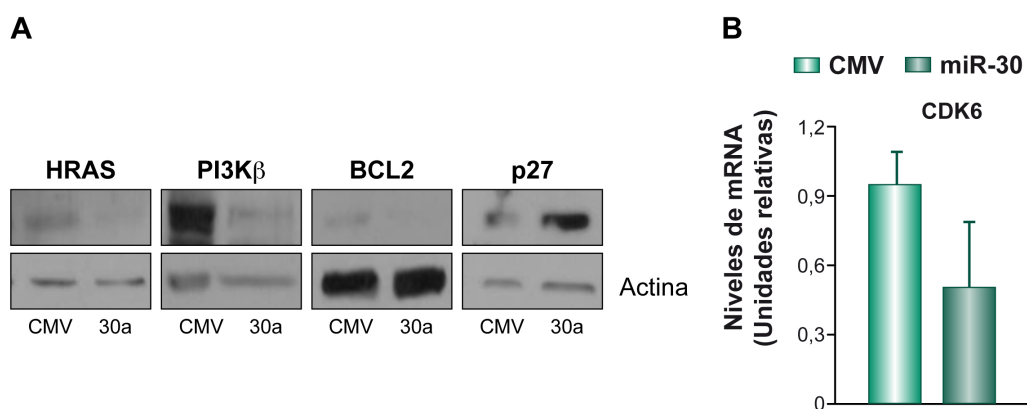
Sitios de unión para el mir-30a en la vía PI3K				
Gen	Posición del sitio de unión	Suma miRSVR scores	Hebra	Longitud del 3'UTR
E2F3	857 y 1746	-0,91	5p	3284
KRAS	534, 2254, 2891, 4353 y 4395	-1,52	3p y 5p	4670
NRAS	287, 301, 848, 2559 y 2574	-0,33	3p y 5p	3633
PIK3C2B	241 y 2120	-0,35	5p	2221
PIK3CD	113, 1070 y 1568	-0,96	3p y 5p	2067
mTOR	55	-0,84	3p	953
S6K (RPS6KB1)	2014, 2111, 2725 y 3394	-0,66	3p y 5p	3653
MDM2	47, 3082, 3886 y 5477	-0,05	3p y 5p	5582
NFKB	547	-0,24	3p	707
CDK6	144 1305 1120 2665 2803 4865 4900 5581 6319 9301	-0,0053	3p y 5p	10217

**Tabla 10.-: El miR-30a posee dianas de alto valor predictivo en varios efectores de la vía PI3K.** Análisis realizado con el algoritmo de predicción miRanda sobre la presencia de elementos de reconocimiento del miR-30a en los 3'UTR de varios constituyentes de la vía PI3K.

Tras un análisis exhaustivo de las hipotéticas dianas del mir-30a dentro de los efectores de la vía PI3K, el algoritmo computacional MiRanda reveló la presencia de sitios de unión de alto valor predictivo, según el mirSVR, para RAS, PI3K $\beta$ , E2F3, BIM, MDM2, NF- $\kappa$ B, BCL-2 y CDK6 (Tabla 10).

Para determinar la relevancia biológica de estas predicciones analizamos, en células Cal62 transfectadas con el mir-30a o un vector control, la expresión de algunos de los efectores más importantes de la vía en el contexto del carcinoma tiroideo. Entre los iniciales se escogieron RAS y PI3K $\beta$  y entre los finales al factor antiapoptótico BCL-2, la quinasa dependiente de ciclina CDK6 y su inhibidor 1B (p27<sup>Kip1</sup>), siendo este último un inhibidor de la vía que además es reprimido por ella, y que no tiene sitios de unión para el mir-30a.

La sobreexpresión del mir-30a en células Cal62 supuso una reducción significativa en la expresión proteica de RAS, de PI3K $\beta$  y de BCL-2 (Fig. 45 panel A). Además, los niveles proteicos del inhibidor de la vía p27, resultaron aumentados y los niveles de mRNA de CDK6 disminuyeron hasta la mitad, aunque en este último caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 45 panel B).



**Fig. 45-. MiR-30a reduce la expresión de efectores clave de la vía PI3K. Panel A:** Western Blot de las proteínas HRAS, PI3K $\beta$ , BCL-2 y p27 en extractos totales. La expresión de  $\beta$ -Actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína cargada. Imagen representativa de 3 ensayos independientes. **Panel B:** Expresión relativa de los niveles de mRNA de LIN28B analizados por qRT-PCR. La expresión de Actina se utilizó para normalizar. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes.

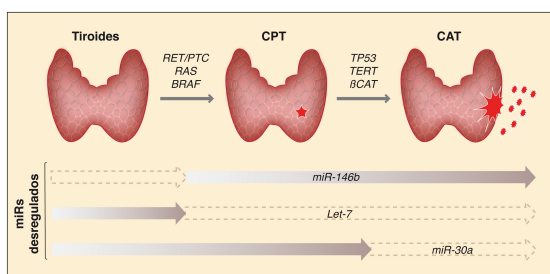
Estos datos apuntan a que la pérdida de expresión del mir-30a en el contexto tumoral tiroideo favorece la hiperactivación de la vía PI3K/AKT que -en el proceso tumorigénico tiroideo- está demostrado comporta un incremento de la supervivencia, la motilidad y la proliferación.

### 2.3.6.- La supresión del mir-30a exagera procesos oncogénicos ya iniciados en el CPT contribuyendo al proceso de dediferenciación resultante en el CAT

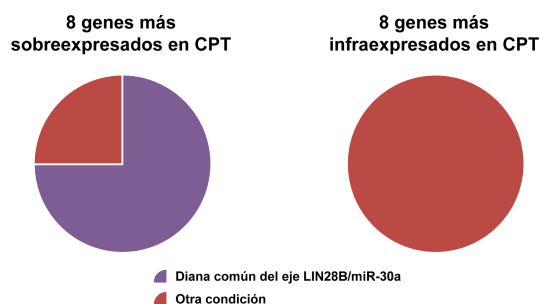
El análisis de secuenciación masiva de última generación que hemos realizado comparando el miRnoma del CPT con el de su contraparte de tejido normal, mostró que el mir-30a disminuye su expresión en un 44% en este carcinoma. Esta moderada disminución concuerda con lo descrito en otros estudios, de secuenciación masiva posteriores y de Arrays previos, centrados en la progresión tumoral del carcinoma tiroideo diferenciado. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que el silenciamiento total del mir-30a se da de manera exclusiva en el CAT (Nikiforova, 2008, Visone, 2007, Park 2008, todos recogidos en Fuziwara, 2014).

Este fenómeno se contrapone con lo sucedido con la pérdida de expresión de los genes de la familia Let-7, que tiene lugar al inicio de la oncogénesis con en el carcinoma totalmente diferenciado (Fig. 46 panel izquierdo).

Aunque la familia Let-7 y el mir-30a no forman parte del mismo cluster o miRNA primario (coordenadas genómicas chr9: 94175957-94176036 y chr6: 71403551-71403621 respectivamente), ni se cree que sean genes parálogos, al no tener homología alguna entre ellos, sí comparten una sorprendente cantidad de dianas en el transcriptoma positivamente desregulado en las neoplasias tiroideas. Un análisis efectuado con el algoritmo miRanda sobre nuestros datos de secuenciación masiva de última generación en el transcriptoma desveló que, entre los 8 genes más sobreexpresados en CPT, el 75% (6) eran a la vez dianas de alto valor predictivo tanto para la familia Let-7 como para el mir-30a. Para ilustrar lo infrecuente de este fenómeno, baste con decir que entre los 8 genes más infraexpresados en CPT, según nuestro análisis, no hubo ninguna diana común del mir-30a y Let-7 (0%) (Fig. 46 panel derecho y tabla 11).



**Fig. 46.- Panel izquierdo:** La desregulación de miRs es escalonada durante la oncogénesis tiroidea: La pérdida de la expresión de Let-7 se da en CPT y CAT, mientras que el silenciamiento de miR-30a se da exclusivamente en CAT. Figura modificada de Fuziwara, 2014.



**Fig. 46.- Panel derecho:** Diagrama de sectores representando las dianas del eje LIN28B/miR-30a entre los genes desregulados en CPT identificados por RNA-Seq. El silenciamiento de miR-30 y la expresión aberrante de LIN28B desreprime los genes más sobreexpresados en CPT pero no los más infraexpresados

Fuziwara (Fuziwara, 2014) (recogiendo el trabajo de Johnson, 2005 y Vergoulis, 2012) define como las dianas desreprimidas de la familia Let-7 más importantes en la oncogénesis tiroidea a RAS, LIN28B y HMGA2. Habiendo validado las dos primeras como dianas del mir-30a observamos que el oncogén HMGA2, descrito por varios autores como determinante en la malignificación tiroidea - (D'Angelo 2014, Pallante 2015; Klemke, 2015; Belge 2008; Berlingieri, 1995) y clasificado por nuestro análisis de secuenciación masiva como el octavo más sobreexpresado en CPT (30,14 veces,  $5,38 \times 10^{-9}$  de p-valor) (Tabla 11), era también considerado por el algoritmo miRanda como una diana de valor predictivo extremadamente alto (mirSVR score:-1.0903).

	Nivel de cambio	P-Valor	FDR	Media en CPT (TPM)	Media en tejido sano (TPM)	Reprimido por miR-30a	Inducido por LIN28B a través de Let-7
<b>ZCCHC12</b>	164,12	5,70E-28	4,42E-24	92,46	0,00	NO	SÍ
<b>LRP4</b>	87,13	1,39E-34	2,15E-30	199,37	1,52	SÍ	SÍ
<b>UCN</b>	42,88	2,86E-11	1,14E-08	23,86	0,00	NO	NO
<b>SCEL</b>	42,05	1,49E-11	6,40E-09	23,70	0,00	SÍ	SÍ
<b>CHN2</b>	41,49	1,86E-20	4,81E-17	1149,36	17,14	SÍ	SÍ
<b>PLAU</b>	37,12	1,44E-19	2,80E-16	71,62	1,25	SÍ	SÍ
<b>TIMM8A</b>	36,03	4,88E-25	2,52E-21	100,88	2,09	SÍ	SÍ
<b>HMGA2</b>	30,14	5,38E-09	1,35E-06	17,49	0,00	SÍ	SÍ

**Tabla 11.-: Los genes más sobreexpresados en CPT son presuntas dianas del eje LIN28B/miR-30a.** Análisis realizado con el algoritmo de predicción miRanda sobre la presencia de elementos de reconocimiento del miR-30a y Let-7 entre los genes sobreexpresados en CPT identificados por RNA-Seq. El oncogén HMGA2, determinante en la malignificación tiroidea, es el octavo gen más sobreexpresado en CPT.

En una primera aproximación, examinamos los niveles de mRNA de HMGA2 en un panel de 15 líneas tiroideas (NThy-ori, FTC, BCPAP, K-1, KTC-1, TPC-1, 8505c, c643, Cal62, Hth7, Hth74, Hth83, OCUT2, SW1736, T235 y T238) clasificadas según el tipo tumoral. Los niveles de mRNA de las células tumorales se normalizaron respecto a los niveles de la línea control Nthy-ori. La única línea usada de CFT no mostró cambios en la expresión de HMGA2 con respecto al control.

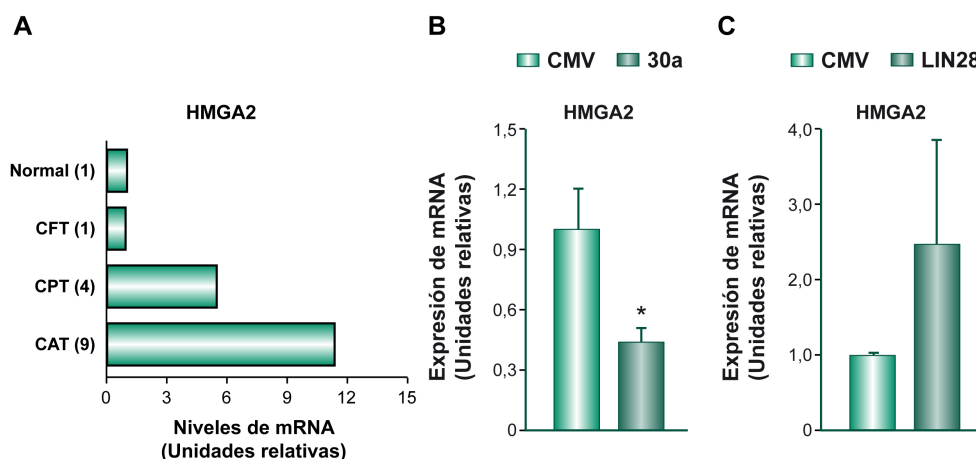
Sin embargo, las 4 líneas provenientes de CPT mostraron un aumento de 5,52 veces en promedio y en las 9 líneas provenientes de CAT el incremento fue de hasta 11,39 veces (Fig. 47 panel A). Estos datos apoyan la hipótesis de que el patrón de expresión de HMGA2 presenta una moderada subida en los primeros estadios de la oncogénesis tiroidea que se dispara al alcanzar los estadios más desdiferenciados y agresivos de la enfermedad.

Para evaluar el efecto del eje LIN28B/mir-30 sobre la expresión de HMGA2 utilizamos la línea celular 8505c y Cal62 para realizar estudios de ganancia de función con ambos componentes del eje. Las células Cal62 que sobreexpresaron el mir-30a mostraron niveles de mRNA significativamente



inferiores que la condición control. De manera inversa, la sobreexpresión de LIN28B en las células 8505c conllevó una subida en los niveles de expresión de mRNA de HMGA2, aunque ésta última no resultó estadísticamente significativa (Fig. 47 B y C).

Estos datos sugieren que mir-30a y LIN28B, son responsables de regular la expresión proteica del oncogén HMGA2 en la célula folicular tiroidea tumoral.



**Fig. 47.- Panel A: La expresión de HMGA2 aumenta según progresa la tumorigénesis.** Expresión relativa de los niveles de mRNA de HMGA2 analizados por qRT-PCR en un panel de 15 líneas celulares tiroideas. La expresión de actina se utilizó para normalizar. **Panel B y C : HMGA2 es una diana del eje LIN28B/miR-30a.** Expresión relativa de los niveles de mRNA de miR-30a y LIN28B analizados por qRT-PCR en células Cal62 y 8505 respectivamente. La expresión de actina se utilizó para normalizar. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes.

### 2.3.7- Mir-30a reprime la expresión de importantes marcadores de TEM

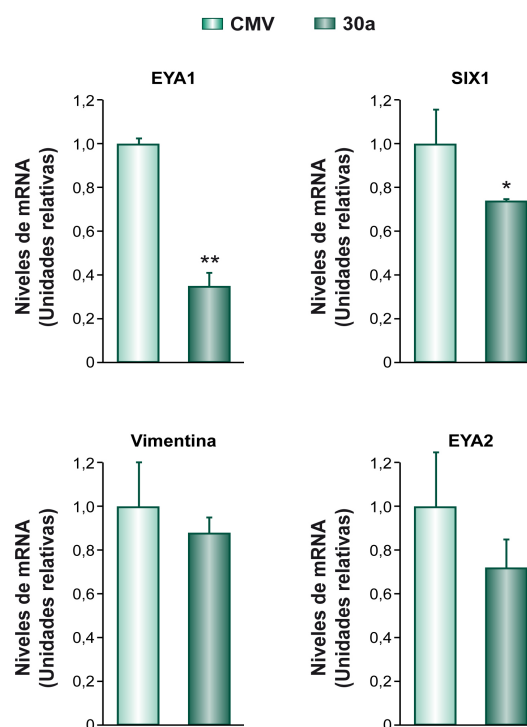
La herramienta bioinformática miRanda predice multitud de dianas para el miR-30a de entre los marcadores de transición epitelio mesénquima (Tabla 12). Varios grupos han validado molecularmente algunas de estas dianas. Así, el grupo del Dr. Huttelmeier (Braun, 2010) demostró que, en el contexto tiroideo, la familia mir-30 reprime la expresión de los genes ZEB2 y Vimentina (VIM) marcadores del fenómeno de transición epitelio mesenquima (TEM); asimismo reprime la expresión de la proteína SMAD2 mediadora de la señal de TGFβ. Además, estos autores observaron un aumento significativo de la expresión de E-Cadherina (CDH1) -el marcador epitelial más importante- y una disminución en la invasión en células derivadas de CAT.

Por otro lado, el laboratorio del Dr. Allgayer demostró que el miR-30a inhibe la transición epitelio mesénquima a través de su diana SNAIL en cáncer de pulmón (Kumarswamy, 2012).

Sin embargo, numerosas presuntas dianas permanecen aún sin validar. Por ello, decidimos investigar las restantes dianas para determinar el alcance de la regulación del miR-30a sobre los marcadores de TEM.

Gen	Posición del sitio de unión	Hebra	Longitud del 3'UTR
EZH1	562	5p	2251
	1764	5p	
EZH2	11	3p	263
SNAI1	692 (-1,12)	5p	825
	571	3p	
SNAI2	341 (-1,138)	3p	1127
	1 (-0,83)	5p	
	445	5p	
	872 (-0,23) 5p	5p	
ZEB1	1003 (-0,4)	3p	1935
	1243 (-1,2)	3p	
	829 (-0,3)	5p	
ZEB2	364 (-0,45)	3p	1433
	413	5p	
	1768 (-0,48)	5p	
EYA1	1856 (-0,2)	5p	1905
	683 (-0,2)	5p	
	163 (-0,66)	5p	
EYA2	180 (-0,511)	5p	709
	1016	3p	
VIM	574 (-0,313)	5p	322
	1226 (-1,004)	5p	
SIX1	1307	3p	1583
	1593 (-0,41)	3p	
	646 (-0,44)	5p	
PAI	932	5p	1819
FN1			1097

**Tabla 12.-: Marcadores de transición epitelio-mesénquima con elementos de reconocimiento para el miR-30a.** Análisis realizado con el algoritmo de predicción miRanda. Entre paréntesis se muestran aquellas puntuaciones de los sitios de unión con miR-30a inferior a -0,2.



**Fig. 48.- MiR-30a reprime la expresión de algunos marcadores TEM.** Expresión relativa de los niveles de mRNA de EYA 1 y 2, SIX1 y VIM fueron analizados por qRT-PCR en células Hth74. La expresión de Actina se utilizó para normalizar. Cada barra representa la media y la SD de 3 experimentos independientes.

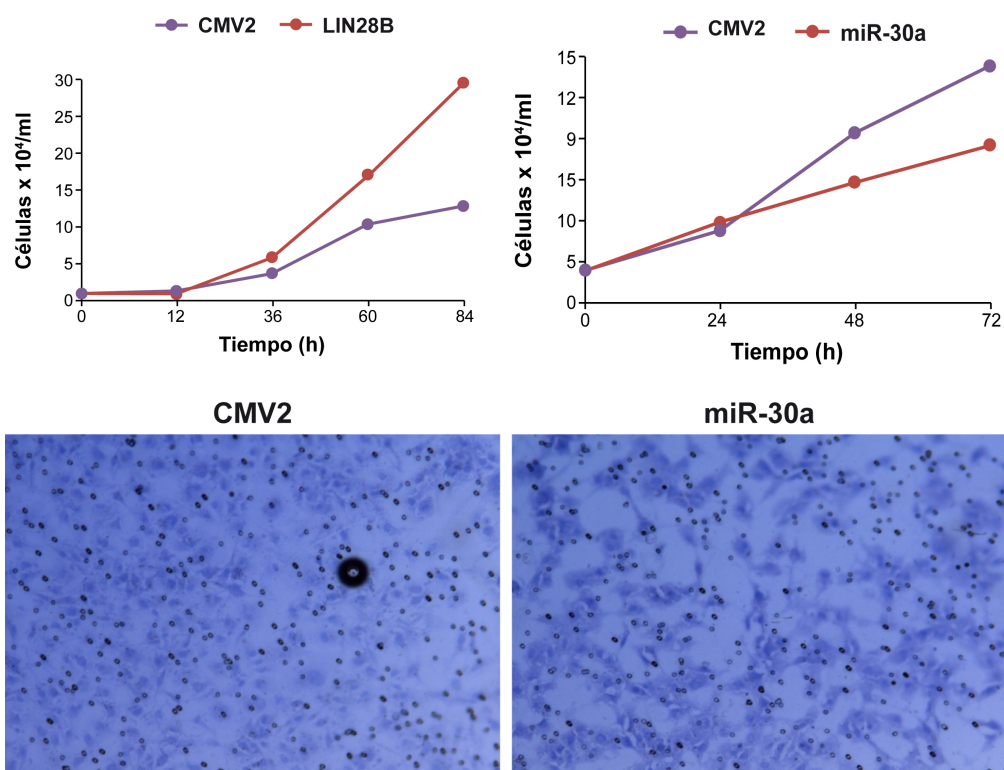
La sobreexpresión del miR-30a en la línea celular procedente de CAT Hth74 cursó con una reducción significativa de los niveles de mRNA de los genes EYA1 y SIX1. Los niveles de EYA2 y VIM también se redujeron, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 48). Sin embargo los niveles de FN1 y PAI1 no resultaron reducidos y en el caso de CDH1 no se obtuvo el aumento descrito por Huttelmeier y colaboradores (Braun, 2010) (datos no mostrados).

Estos datos indican que el miR-30a es capaz de reducir la expresión de algunos marcadores mesenquimales relacionados con la progresión tumoral. Por tanto su disminución significativa en cáncer de tiroides, hace que estos marcadores de invasión y metástasis aumenten en esta patología tumoral.

### 2.3.8- El eje LIN28B/miR-30a controla la invasión y la proliferación en la célula folicular tiroidea

Tras estudiar la regulación que ejerce el eje LIN28B/miR-30a sobre la expresión génica de la vía PI3K, HMGA2 y los marcadores TEM, quisimos saber cual era el efecto global sobre el comportamiento celular en relación a los parámetros de proliferación e invasión. Para ello se realizaron estudios de ganancia de función de LIN28B en la línea celular 8505c que presenta una baja expresión de esta proteína, y del miR-30a en células Cal62 con alta expresión de LIN28B.

Para cuantificar el impacto de estos resultados sobre el crecimiento celular, se midió la tasa de proliferación con un contador automático de células. Los ensayos de proliferación demostraron que LIN28B aumenta y miR-30a disminuye, en las mencionadas líneas celulares, el crecimiento celular entre 72h y 84 h, en aproximadamente 1,5 veces (Fig. 49 panel superior).



**Fig. 49.- El eje LIN28B/miR-30a controla la invasión y la proliferación en la célula folicular tiroidea. Panel Superior:** Ensayos de proliferación efectuados en células 8505 (izquierda) y Cal62 (derecha) para medir la influencia de la sobreexpresión de LIN28B y miR-30a respectivamente. Se realizaron mediciones del número de células con un contador automático cada 24h. Cada punto es la media de 3 pocillos distintos. Figura representativa de 2 ensayos independientes. **Panel inferior:** Ensayo de invasión realizado con células Cal62 transfectadas con el miR-30a o su vector control, en pocillos de Matrigel. Imagen representativa de 3 ensayos diferentes.

Con respecto a los ensayos de invasión en matrigel, pudimos observar como las células transfectadas con el vector de expresión que recuperaba la expresión del miR-30a invadieron en menor número la parte inferior del pocillo poroso con respecto a aquellas pertenecientes a la condición control (Fig. 49 panel inferior).

En cambio, la transfección con LIN28B no supuso una diferencia observable en el número de células contabilizadas en el ensayo de invasión (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren que el eje LIN28B/miR-30a controla la proliferación, mientras que el miR-30a disminuye la capacidad invasiva en la célula tiroidea anaplásica.

## **Discusión**



## **1-. El circuito regulatorio miR-146b-3p/PAX8/NIS regula la diferenciación y la captación de yodo en el carcinoma tiroideo**

En este trabajo de Tesis doctoral, hemos identificado una red regulatoria de miRs involucrada en el proceso de desdiferenciación de la célula tiroidea tumoral. Mediante ensayos funcionales hemos caracterizado el miR-146b-3p como un represor de PAX8 y NIS, y hemos demostrado que este miR y PAX8 se regulan mutuamente evidenciando la existencia de un circuito regulatorio que determina el fenotipo desdiferenciado en CPT.

Entender los eventos moleculares que conllevan a la pérdida del fenotipo diferenciado en el cáncer de tiroides y, en especial, a la pérdida de la expresión de NIS, resulta de gran interés por su potencial clínico. El simportador de yodo NIS media el transporte activo de yodo hacia el interior de la célula tiroidea, la base para el diagnóstico y el manejo terapéutico con radioyodo de los pacientes con cáncer de tiroides.

En este trabajo demostramos por primera vez que NIS está regulado por miRs en el carcinoma tiroideo. Estudios recientes han señalado al miR-339 como un potente represor de NIS (Lakshmanan, 2014). Este miR es, efectivamente, el que posee un coeficiente mirSVR más significativo de entre los elementos de reconocimiento de miRs que alberga el 3'UTR de NIS, y los resultados indican que *in vitro* produce un claro silenciamiento de la expresión de NIS e inhibición de la captación de yodo. Sin embargo, el análisis de secuenciación desarrollado en este trabajo, así como estudios previos (Swierniak, 2013; TCGA, 2014; Huang, 2014), indican que el miR-339 no tiene ningún valor ni en la fisiología ni en la patología tiroidea porque no sólo no está desregulado en ningún carcinoma tiroideo, sino que además sus niveles de expresión son casi indetectables tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Mediante diversos experimentos, hemos probado que el miR-146b-3p se une a la región 3'UTR de NIS -específicamente entre la posición nucleotídica 3-9- dificultando la traducción proteica y, por consiguiente, reduciendo la captación de yodo en la célula folicular.

Multitud de explicaciones mecanísticas han sido sugeridas para explicar la represión de NIS en el carcinoma tiroideo intentando disponer de nuevas perspectivas terapéuticas que traten de reinducir la captación de yodo (Portulando, 2014; Spitzweg, 2014). Prácticamente todas se fundamentan en la represión transcripcional inducida por vías de señalización aberrantes o eventos epigenéticos.

En este trabajo presentamos un mecanismo adicional inédito basado en la regulación postranscripcional de NIS mediante la interacción coordinada de miRs y factores de transcripción regulados entre sí.

También demostramos que la expresión del miR-146b-3p se ve reprimida por TSH en la célula

tiroidea diferenciada (células PCCl3), y que IGF1 y TGF $\beta$ , los dos represores más conocidos de la inducción de NIS dependiente de TSH, revierten de manera parcial este efecto inhibitorio.

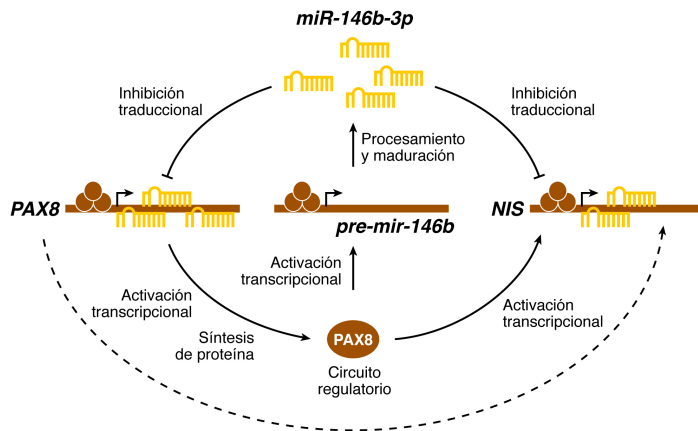
Con este hecho revelamos la trascendencia de la regulación hormonal en la homeostasis del miRNoma. Esta interpretación está de acuerdo con lo que previamente había sido evidenciado en otro trabajo que demostró que la señalización ejercida por la TSH a través de la activación de CREB reprime la expresión de diversos miRs interactuando de manera directa con su región reguladora (Leone, 2011).

Como la señalización inducida por TSH está alterada durante la carcinogénesis tiroidea, los miRs consiguen liberarse de esta represión mediada por TSH. Adicionalmente a la alteración de la señalización inducida por TSH, la señalización mediada por TGF $\beta$  y PI3K se encuentra sobreactivada en el carcinoma tiroideo (Riesco-Eizaguirre, 2009; Spitzweg, 2014). Así, nuestros datos señalan que las anomalías de la señalización de factores de crecimiento claves como TSH, IGF1 y TGF $\beta$ , contribuyen a la fuerte sobreexpresión que el miR-146b presenta en el cáncer de tiroides (35 veces superior a la normal).

Además de regular a NIS, los miRs más abundantes están implicados en la modulación de otros genes esenciales para la diferenciación tiroidea. PAX8 es el factor de transcripción más importante para inducir la expresión de NIS y es fundamental para el desarrollo de la glándula tiroidea y el mantenimiento de su fenotipo diferenciado en el adulto. Así mismo, este factor de transcripción es un regulador predominante en otros procesos celulares fundamentales como la regulación del ciclo celular, la reparación del DNA, el control metabólico y el mantenimiento de la polaridad celular (Ruiz-Llorente, 2012; Di Palma, 2013; y observaciones no publicadas realizadas en nuestro laboratorio)

Este trabajo muestra también como PAX8 es presuntamente regulado por 5 de los miRs sobreexpresados más abundantes en CPT, lo que parece indicar que este factor es un nodo o núcleo de intersección de varios elementos regulatorios que confluyen en él. Este hecho parece concordante con la relevancia biológica que tiene este factor en la fisiología tiroidea. También hemos demostrado que el elemento regulatorio en el que hemos centrado esta parte de nuestro trabajo, el miR-146b-3p, reprime la expresión de PAX8 a través de la unión directa a su 3'UTR. De manera inversa, también pudimos comprobar que PAX8 y el miR-146b se regulan mutuamente y comparten dianas comunes, especialmente genes implicados en el metabolismo del yodo. Estos hallazgos evidencian que estos complejos miR-factor de transcripción conforman circuitos de regulación que modulan eficientemente la expresión génica en la glándula tiroidea (Fig. 50).





**Fig. 50-. NIS, miR-146b y PAX8 conforman un circuito regulatorio.** El factor de transcripción PAX8 regula la expresión de NIS y de miR-146b. Este miR a su vez reprime la expresión de ambos efectores.

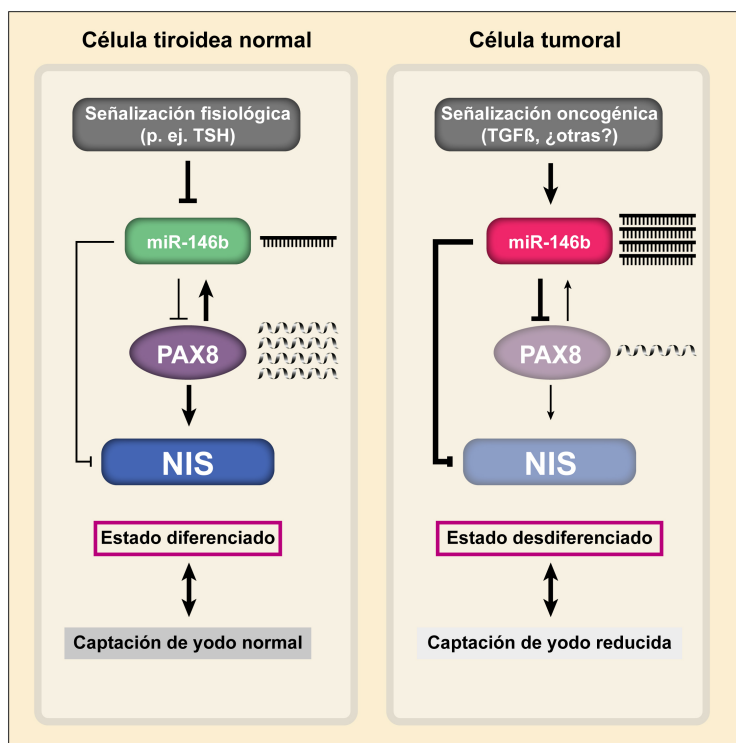
Este mecanismo que involucra a miRs y factores de transcripción como circuitos regulatorios es frecuente en la biología (Shalgi, 2007; Martínez, 2009; Herranz, 2010). Uno de los tipos de circuitos regulatorios descritos es el circuito de proalimentación en donde el miR reprime de manera simultánea tanto el gen diana como el factor de transcripción encargado de activar la expresión de ese gen diana. Este tipo de circuitos permiten una regulación integral que sólo tolera la reinducción de la expresión del gen diana cuando los niveles del miR dominante decaen. En esta Tesis hemos descrito el circuito miR-146b/PAX8/NIS como ejemplo de un circuito proalimentativo en donde el miR-146b reprime el FT PAX8 y a su diana transcripcional NIS.

De manera complementaria a ese circuito de proalimentación, también describimos otro circuito en el cual miR-146b y PAX8 conforman un doble circuito de retro-alimentación negativa donde el factor de transcripción PAX8 limita su propia acción mediante la inducción de la expresión de su propio represor, el miR-146b.

Este circuito mantiene un equilibrio de coexpresión de ambos componentes que oscila en función de señales extracelulares que lo afectan. Como consecuencia, estos circuitos regulatorios amplifican efectos que han acontecido previamente. Esto es: una señalización inicial desinhibe la expresión del miR, que a su vez reprime sus dianas directas entre las que se encuentra el factor de transcripción. Consecuentemente, todas las dianas transcripcionales del FT quedan reprimidas y algunas -aquellas que son a la vez dianas del miR- por dos mecanismos aditivos. La amplificación de la señal regulatoria ejercida por el circuito de PAX8/miR-146b que hemos descrito afecta a procesos biológicos esenciales como la diferenciación de la célula tiroidea.

En conjunto, planteamos un sistema integrado que opera para determinar el fenotipo diferenciado de la célula folicular tiroidea y, por extensión, la captación de yodo (Fig. 51). En condiciones fisiológicas, la TSH ejerce su acción manteniendo niveles bajos de miR-146b y altos de PAX8 en la célula tiroidea. En el contexto tumoral, la afectación de la señalización inducida por TSH y la

hiperactivación oncogénica de algunas vías como las MAPK o PI3K revierte el equilibrio regulatorio dando lugar a altos niveles de miR-146b y bajos de PAX8. Esto conlleva cambios en el estado de diferenciación celular, que podrían contribuir a la refractariedad al tratamiento con yodo radiactivo. Sin embargo, este estado podría ser a su vez modificado si una señal externa consigue revertir la señalización oncogénica y volver a reducir los niveles del miR-146b. Ejemplos de esta señal externa podrían ser la administración de TSH recombinante, inhibidores de la vía de las MAPK o incluso la administración de inhibidores específicos de la acción de los miRs (antagomiRs).



**Fig. 51.- El circuito compuesto por miR-146b, PAX8 y NIS controla la diferenciación y la captación de yodo en el carcinoma tiroideo.** Señales fisiológicas como la TSH reprimen la expresión del miR-146b e inducen altos niveles de NIS y PAX8 en el tejido tiroideo sano. La señalización oncogénica aberrante desreprime la expresión de miR-146b, que conlleva la represión de PAX8 y sus dianas comunes. Como resultado, las células tumorales adoptan un estado más dediferenciado que incrementa su resistencia al tratamiento con yodo radiactivo.

Este trabajo define por primera vez las principales dianas de las hebras maduras miR-146b-5p y 146b-3p producidas por el precursor pre-mir-146b. Como ya había sido descrito por otros grupos, ambas hebras están entre los miRs más sobreexpresados en el CPT (Swierniak, 2013; Dettmer, 2013) y, aunque los datos indican que se produce el llamado fenómeno de *preferencia de hebra* por la cual una de las hebras tiene más afinidad por ser cargada en el RISC que la otra, la hebra 3p sobrepasa con creces los criterios más restrictivos para ser considerada una hebra funcionalmente significativa. El miR-146b ha resultado ser un factor pronóstico para el desarrollo de CPT y está asociado con características clinicopatológicas agresivas y una evolución clínica muy desfavorable (Chou, 2013). Además, se ha observado que esta sobreexpresión tumoral se hace extensible al suero en pacientes con CPT (Lee, 2013). Así mismo, varias de sus dianas han sido validadas en el carcinoma tiroideo (Geraldo, 2012). De esta manera, aunque deberá ser corroborado por experimentos *in vivo*,

numerosas evidencias señalan que el miR-146b es un oncomiR en el contexto del carcinoma tiroideo. Nuestros resultados contribuyen a reforzar sustancialmente estas evidencias al demostrar que una de las hebras hace diana de manera específica en NIS y PAX8, y contribuye a silenciar FOXE1 de manera inespecífica, todas ellas proteínas clave en el proceso de desdiferenciación que acontece en el carcinoma tiroideo.

Contrariamente a los perfiles de expresión trazados anteriormente en base a microarrays, la secuenciación masiva de última generación permite el estudio de la expresión de los miRs con una precisión sin precedentes en todos los parámetros cuantitativos y cualitativos.

Como hemos mencionado anteriormente, el análisis cuantitativo nos permite discriminar, de entre los miRs desregulados, aquellos que son efectivamente funcionales. De hecho, aproximadamente el 80% de los miRs detectados en la glándula tiroidea (miRNoma tiroideo) no superan el umbral de Mullondakov y por tanto no están considerados como miRs funcionales según este criterio (Mullondakov, 2012).

En este sentido, nuestro estudio también ha ayudado a entender como una hebra con una baja avidez por ser cargada en el RISC y, por tanto, no funcional en el contexto fisiológico, puede, al ser su precursor hiperactivado por una señal oncogénica, sobrepasar el umbral mínimo, y ser efectora en el contexto tumoral.

El primer estudio de secuenciación masiva de última generación aplicado para la determinación del miRNoma tiroideo y del carcinoma papilar se centró en analizar la expresión diferencial de isomiRs (Swierniak, 2013). En otro estudio reciente, se analizaron los conjuntos de datos disponibles en la plataforma de datos del TCGA (The Cancer Genome Atlas Data Portal) sobre el CPT, y se centraron en el análisis de procesos inmunes enriquecidos modulados por circuitos que involucran a miRNAs y sus dianas así como la existencia de RNAs codificantes competidores endógenos de unión a miRs que participan en esos procesos (Huang, 2014). Ninguno de estos dos estudios se centraron en los genes de diferenciación tiroidea ni del metabolismo del yodo y su regulación por miRs.

Muy recientemente, durante la finalización experimental de esta tesis doctoral, la red de investigación del TCGA, publicó un artículo que, combinando estudios genómicos, transcriptómicos y proteómicos en más de 400 tumores papilares tiroideos, ha marcado un antes y un después en la comprensión de los mecanismos que suceden en el CPT. En él correlacionan la desregulación de 3 miRs seleccionados miR-21, miR-146b, y miR-204 con la desregulación de 9 factores tiroideos - incluyendo a NIS pero no a PAX8-, evidenciando la contribución de este fenómeno con la pérdida de diferenciación. Sin embargo, la validación de estos indicios requiere la ejecución de ensayos funcionales que demuestren el impacto real de estas observaciones en la diferenciación tiroidea.

En cambio, en esta Tesis doctoral sí que hemos realizamos ensayos funcionales para demostrar la

contribución clave del miR-146b en la pérdida del fenotipo diferenciado tiroideo en el CPT.

Como resumen, hemos descrito los miRNomas funcionales relativos al tejido tiroideo normal y al CPT, proveyendo de medios para la exploración del papel regulatorio de los miRs en el contexto tiroideo normal y tumoral. Hemos establecido que los miRs desempeñan importantes funciones formando parte de circuitos regulatorios que modulan la expresión de genes fundamentales para la diferenciación tiroidea. También evidenciamos la existencia de un circuito regulatorio conformado por el eje miR-146b-3p–PAX8–NIS como un regulador del estado de diferenciación en la célula tumoral tiroidea.

Debido a todo lo anterior, la inhibición específica del miR-146b, uno de los miRs clave de la red regulatoria descrita, puede representar una buena estrategia terapéutica en pacientes afectados por el CPT, para tratar de reinducir la captación de yodo radiactivo en las metástasis refractarias.

## **2.- El microRNA-146b media el silenciamiento de PTEN y promueve la hiperactivación de la vía PI3K/AKT provocando la progresión del carcinoma tiroideo**

PTEN es un potente supresor tumoral que se encuentra silenciado en mayor o menor medida en varios tipos tumorales, incluyendo glioblastoma, melanoma, cáncer de pulmón, de mamá, riñón, próstata y endometrio, además de en el carcinoma tiroideo (Dahia, 1997; Steck, 1997; Halachmi, 1998; Dahia, 2000). Diversas evidencias acumuladas sugieren que la inactivación de PTEN por diferentes mecanismos (deleciones hemizigóticas, silenciamiento transcripcional o traduccional o compartimentalización subcelular inapropiada) juega un papel decisivo en la patogénesis de los carcinomas tiroideos, especialmente en los más agresivos e indiferenciados. (Frisk, 2002; Bruni, 2000 ; Paes, 2008)

Además, en el contexto tiroideo, está demostrado que el silenciamiento de PTEN es el resultado de una amplia variedad de mecanismos epigenéticos y regulatorios de silenciamiento más que la consecuencia de una inactivación estructural bialélica de tipo clásico. Así el 16% de los CFT presentan una reducción en los niveles de expresión de PTEN sin presentar alteración alguna a nivel genómico. Este porcentaje se eleva al 33% de los CPT y al 27% de los anaplásicos (Frisk, 2002; Bruni, 2000; Paes, 2008) (Tabla 13). Sin embargo, estos mecanismos de silenciamiento extragenómicos son en su mayoría desconocidos.

	Adenoma folicular	Carcinoma folicular	Carcinoma papilar	Carcinoma anaplásico
Mutación en PTEN	0/183 (0%)	10/147 (6.8)	3/163 (1,8%)	8/59 (13,6%)
Reducción en PTEN	1/36 (2,7%)	17/76 (22,4%)	5/14 (35,7%)	9/22 (40,9%)
Diferencia	2,7%	15,6%	33,9%	27,3%

**Tabla 13-. Frecuencia de anomalías en PTEN en los distintos carcinomas tiroideos.**

Se muestra el porcentaje de casos con PTEN mutado, con PTEN reducido, y la diferencia entre ellos.

Modificada de Paes, 2008.

En este trabajo, hemos descrito un acontecimiento doblemente novedoso: por un lado un mecanismo oncogénico de silenciamiento postranscripcional de PTEN, que involucra al miR más desregulado en el carcinoma tiroideo; y por otro lado, hemos identificado una nueva diana del miR-146b como mecanismo oncogénico de este RNA no codificante.

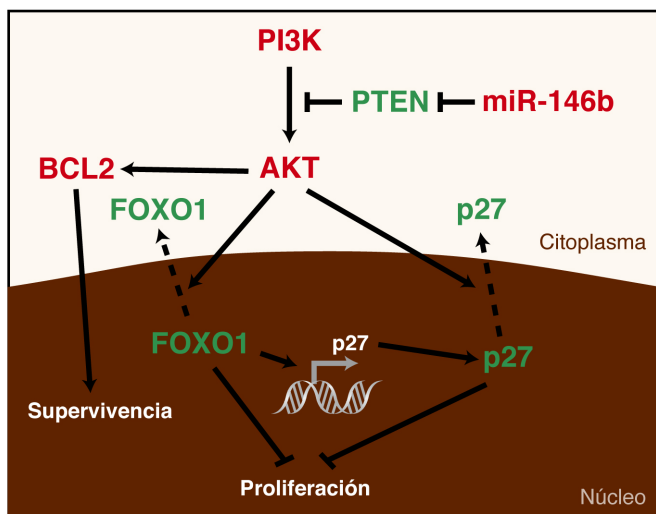
Anteriormente, Chou y colaboradores (Chou, 2013) demostraron que una alta expresión de miR-146b era un factor independiente de mal pronóstico en CPT. También demostraron en la línea celular BCPAP, procedente de CPT, que este miR contribuye a la progresión tumoral y a la resistencia ante la apoptosis inducida por quimioterápicos. Sin embargo, no aportaron ninguna explicación mecanística para este proceso. Aunque ha habido trabajos anteriores que han propuesto posibles dianas para explicar el comportamiento pro-oncogénico del miR-146b como ZNRF3, PRRX1 y SMAD4 (Deng, 2015; Hardin, 2014; Geraldo, 2012), ninguna de estas dianas explica la multifacética labor observada del miR-146b en invasión, migración, proliferación y supervivencia; ni contribuye a la activación de una de las vías de señalización más importantes en la patología neoplásica tiroidea. Además, hemos demostrado que este silenciamiento es ejercido de manera directa a través de la unión del miR-146 al 3'UTR de PTEN y que conlleva una correlación inversa entre los niveles de expresión de ambos.

Paradójicamente, durante el proceso de escritura de esta tesis doctoral, se publicaron dos trabajos llevados a cabo con líneas celulares hepáticas y mamarias neoplásicas (Phuong, 2015; Jiang 2015) donde la administración exógena del miR-146b conllevó el rescate en la expresión de PTEN, que previamente habían perdido por la inducción de esteatosis y de resistencia a los quimioterápicos respectivamente. El mecanismo propuesto es la supresión de la metilación del promotor de PTEN. Estas observaciones son perfectamente compatibles con nuestros resultados sobre la represión directa de PTEN por parte del miR-146b, dado que el *dianoma* o conjunto de dianas de un determinado miR varía a nivel intertisular, al hacerlo también el transcriptoma. Esto puede dar lugar a que el efecto de la inhibición de represores de PTEN expresados en estos tejidos sea mayor que el efecto de la represión ejercida sobre el propio transcrito. Resultados no publicados obtenidos en nuestro laboratorio confirman que la sobreexpresión del miR-146b cursa, no sólo con un silenciamiento de

PTEN, sino con un aumento marcado de los niveles de pAKT S473.

Por otra parte, hemos descrito que la sobreexpresión del miR-146b promueve la exclusión nuclear de FOXO1 y p27 y la disminución absoluta en los niveles de este último, además de inducir la sobreexpresión del factor antiapoptótico BCL-2. Usando tejido de 77 pacientes con neoplasias tiroideas diferenciadas, Acibucu y colaboradores (Acibucu, 2014) encontraron una significativa correlación negativa entre los niveles del miR-146b y p27 que, además, determinaba el riesgo de invasión extracapsular, vascular, metástasis linfonodulares y distantes. Sin embargo no fueron capaces de aportar ningún mecanismo explicativo de este fenómeno. Este trabajo es, por lo tanto, novedoso también por haber demostrado un vínculo mecanístico entre estos fenómenos anteriormente descritos (Fig. 52).

Desde otra perspectiva, nuestros resultados sobre los efectores intermedios y finales que median la acción del miR-146b se ven avalados por resultados de otros grupos y obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio. Así, trabajos anteriores demostraron que la actividad supresora de tumores de PTEN en el contexto tiroideo está en gran parte mediada por p27 (Bruni, 2000) y que la hiperactivación de la vía PI3K cursa con una translocación citoplasmática de FOXO1 que controla la activación transcripcional de p27 y promueve la tumorigénesis tiroidea.



**Fig. 52.- El microRNA-146b aumenta la proliferación y la supervivencia de la célula tumoral.** La desrepresión oncogénica del miR-146b inhibe la expresión de PTEN sobreactivando la vía PI3K. Esta sobreactivación conlleva la represión de la función de p27 y FOXO1 y el aumento en la actividad de BCL-2.

Por último hemos constatado que la señalización alterada de estos genes tiene un efecto inductor de la proliferación desencadenando la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular y aumenta la supervivencia en la célula folicular tiroidea.

Burger y colaboradores (Burger, 2014) demostraron recientemente que los timocitos de ratón deficientes en PTEN sobreactivaban la expresión del miR-146b más que cualquier otro miR. Aunque

el papel de este miR en las lesiones premalignas timocíticas parece ser opuesto y la extrapolación de efectos biológicos de otros tejidos al contexto tiroideo ha resultado un fracaso en numerosas ocasiones, estos datos podrían sugerir que entre las señales oncogénicas que desencadenan la activación del miR-146b podría estar la activación de la propia vía PI3K/AKT, creando así un circuito de retroalimentación positiva de progresión tumoral.

En resumen, la inactivación de PTEN por parte del miR-146b puede ser considerada como un fenómeno con un papel importante en la carcinogénesis anaplásica, donde la profunda incapacidad para llevar a cabo la detención del ciclo celular y el proceso apoptótico pueden acarrear la inestabilidad genómica que conlleva los eventos adicionales que conducen al carcinoma desdiferenciado.

### **3.- El eje LIN28B/mir-30a controla la invasión y la proliferación en la célula folicular tiroidea**

En primer lugar, en esta parte del trabajo de Tesis Doctoral, hemos caracterizado la regulación de la expresión de Lin28B en las condiciones más relevantes para la fisiología y la patología tiroidea. Así, en concordancia con lo descrito anteriormente por otros grupos (Piskounova, 2011), nuestros resultados sitúan a LIN28B en un contexto desdiferenciador y proliferativo. La hormona TSH, el principal regulador positivo de la diferenciación tiroidea, ha demostrado reprimir la expresión de esta proteína. Inversamente, TGF $\beta$ , con un papel desdiferenciador y malignificador en la neoplasia tiroidea (Pekary, 1997; Riesco-Eizaguirre, 2009), induce un aumento de la expresión de Lin28B en presencia de TSH.

De igual manera, nuestros datos apuntan a que la activación del oncogén RAS o la presencia de IGF1, ambos activadores de la vía PI3K, también inducen un aumento en la expresión de esta proteína oncofetal. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Illiopoulos y colaboradores (Illiopoulos, 2009) que, en el contexto inflamatorio, relacionan RAS e IL-6 con la inducción de Lin28B. En el mencionado trabajo, demuestran que NFKB activa directamente la transcripción de Lin28B. Este hecho, nos provee de un primer mecanismo explicativo para describir el fenómeno observado. De esta manera, podemos hipotetizar que la activación de la vía PI3K ejerce, a través de su diana NFKB (Hutti, 2012), un efecto positivo sobre la expresión de la proteína LIN28B. Esta hipótesis quedó reforzada, al caracterizar un panel de 15 líneas celulares tumorales tiroideas humanas para comprobar la expresión de LIN28B. Así, demostramos una asociación positiva entre esta proteína y mutaciones en la vía PI3K, además de con el grado de desdiferenciación tumoral.

Posteriormente demostramos, por primera vez, que el miR-30a y LIN28B se inhiben mutuamente. Esta relación inversa conforma un eje en el cual la expresión de sus miembros tiende a ser

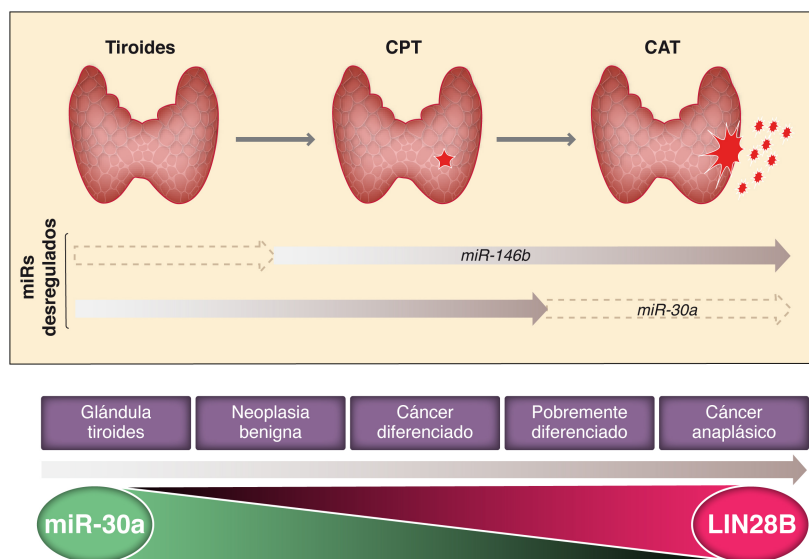
mutuamente exclusiva. También hemos demostrado que la inhibición del miR-30a ejercida sobre LIN28B se ejerce de manera directa al unirse a su 3'UTR. Sin embargo, el mecanismo por el cual LIN28B reduce la expresión del miR-30a no ha sido elucidado. Tras estudiar la estructura secundaria del precursor del mir-30a, observamos, muy cerca del inicio del extremo 5', en la posición 4 de la secuencia, la presencia de una adenina protuberante no apareada rodeada por 2 bases guanina y citosina apareadas (Fig. 43). Como hemos mencionado antes, este diminuto motivo fue demostrado por Lei y colaboradores (Lei, 2012) como un determinante crítico y suficiente de reconocimiento por parte de LIN28 para su unión al RNA. El efecto de la unión de LIN28 al mRNA estudiado en el trabajo de Lei fue descrito como el reclutamiento del cofactor RHA y la estimulación de la traducción proteica. Sin embargo, nos preguntamos si quizá estemos ante un fenómeno intermedio entre los dos descritos para LIN28: i) que el motivo de unión no estuviera en la horquilla del precursor, como sucede en la represión de la familia Let-7, sino en la adenina protuberante flanqueada; y ii) que la estructura secundaria del precursor -muy similar a la de Let-7- conllevara al secuestro del pri- o pre-mir-30a en los nucleolos, fuera del alcance del microprocesador/Exportina5. Futuras investigaciones tendrán que ser llevadas a cabo para verificar este extremo.

La existencia de este eje, entra dentro del marco sugerido por diversos autores donde i) la expresión del miR-30a se ve reducida gradualmente según progresa la tumorigénesis tiroidea (Schwertheim, 2009; Baffa, 2009; Expósito, 2012), y ii) como apuntan algunos trabajos realizados en otros tejidos, el silenciamiento coordinado de varios miRs -entre los que figura el miR-30a- puede ser uno de los mecanismos de reactivación de LIN28B en cáncer (Zhong, 2010; Eguchi, 2013).

Por otra parte, el promotor del miR-30a alberga 5 motivos consenso de unión para el factor de transcripción FOXO1 en los 1000 nucleótidos previos al inicio de la transcripción. Resultados no publicados obtenidos en nuestro laboratorio, confirman que la sobreexpresión de FOXO1 desencadena la activación del promotor del miR-30a de manera significativa.

En conjunto con estos datos, proponemos que el desplazamiento del equilibrio del eje desde la preponderancia del prodiferenciador miR-30 a la preponderancia de la oncoproteína LIN28B se da por una serie de eventos conmutadores relacionados con un aumento de la vía PI3K, mediados por la inhibición de la actividad transcripcional de FOXO1 y el aumento en la actividad de NFκB. Dado que la sobreexpresión del miR-146b es un fenómeno anterior cronológicamente en el proceso tumorigénico al silenciamiento de miR-30a y a la expresión de LIN28B (Fuziwara, 2014), cabe pensar que la inhibición de PTEN por parte del miR-146b anteriormente descrita puede ser uno de los eventos conmutacionales que contribuyen a desencadenar el desplazamiento oncogénico del eje LIN28B/miR-30a en los carcinomas tiroideos (Fig. 53).





**Fig. 53-. Modelo escalonado de desregulación del eje LIN28B/30a.** La expresión oncogénica del miR-146b en CPT promueve una reducción en los niveles del miR-30a a través de la sobreactivación de la vía PI3K. Según progresa el proceso carcinogénico, el eje LIN28B/miR-30a invierte su polaridad desreprimiéndose LIN28B y silenciándose su contraparte, miR-30a.

Además, hemos demostrado que el desequilibrio del eje LIN28B/miR-30a refuerza la activación de la vía PI3K a través de la modulación de muchos de sus elementos constituyentes más importantes. Así, hemos constatado que la expresión del factor antiapoptótico BCL-2, la quinasa dependiente de ciclina CDK6, su inhibidor 1B (p27<sup>Kip1</sup>), la GTPasa RAS, y la subunidad  $\beta$  de la PI3K se ven alteradas con el desequilibrio del mencionado eje. Estos resultados concuerdan globalmente con lo descrito por otros grupos en distintos tejidos y condiciones fisiológicas (Piskounova, 2008; Alajez, 2012), aunque con distintas aproximaciones mecanísticas. De esta manera, para la activación de la vía PI3K por parte de LIN28B han sido propuestos distintos mecanismos como el aumento de los niveles de la quinasa PDK1 (Ma, 2014), la desrepresión de otras dianas en esta vía (IGF1R, IRS2, PIK3IP1 o AKT2) (Zhu, 2011), y por mecanismos de estabilización del mRNA y reclutamiento de cofactores que estimulan su traducción (Lei, 2012).

Adicionalmente, caracterizamos la oncoproteína HMGA2, marcadamente sobreexpresada en CPT según nuestro análisis de secuenciación y señalada por varios grupos como clave en la malignificación tumoral tiroidea (Pallante, 2015; Klemke, 2015; Berlingieri, 1995), como otra diana significativamente regulada por el eje Lin28B/miR-30a en el carcinoma tiroideo.

Por otra parte, en este trabajo hemos demostrado la acción represora del miR-30a sobre los macadores de transición epitelio mesenquima EYA1 y 2, SIX1 y VIM. Además del papel bien establecido de la Vimentina en la adquisición del fenotipo mesenquimal, diversas observaciones no publicadas realizadas en nuestro laboratorio sugieren un papel activo de EYA1/2 y SIX1 en la progresión tumoral del carcinoma tiroideo. Por lo tanto, estos datos indican que, al menos de manera parcial, el silenciamiento tumoral del miR-30a media la adquisición del fenotipo mesenquimal a través de la desrepresión de las mencionadas dianas.

El grado de homología entre un miR y el 3'UTR de un gen determina la naturaleza última de los mecanismos que impiden la traducción proteica mediada por miRs. Así, una alta extensión extraseminal está asociada a fragmentación del mRNA mientras que la circunscripción seminal de la homología está asociada a un bloqueo traduccional. El hecho de que los genes que sufrieron una reducción relevante presentaron los coeficientes de probabilidad más significativos, podría sugerir que los mecanismos involucrados en la regulación de los restantes genes por parte del miR-30a en la célula tiroidea no comportasen una reducción en los niveles de mRNA.

No podemos, por tanto, descartar definitivamente, que la represión inducida por el miR-30a sobre los marcadores TEM se extienda también a PAI1 y FN1. Estos resultados se unen a otras evidencias que apuntarían a la desregulación de este eje como contribuyente de la adquisición de un fenotipo desdiferenciado, tanto por su componente miR-30a (Díaz-López, 2014), como por su componente LIN28B (Zhang, 2015). Así, en este último artículo, se demostró el papel de LIN28B en la activación de la cascada de señalización de TGF $\beta$ .

En último lugar hemos demostrado que la desregulación de este eje, además de contribuir a generar un patrón de expresión génica aberrante, conlleva a un aumento en la proliferación y la invasión en la célula folicular tiroidea. Esto es concordante, con respecto a la parte de LIN28B, con lo descrito con anterioridad en otros tejidos tanto *in vitro* como *in vivo* (Piskounova, 2011; Ma, 2014).

En resumen, en esta última parte del trabajo de Tesis Doctoral hemos descrito la existencia de un novedoso eje regulatorio compuesto por la proteína oncofetal LIN28B y miR-30a, dos elementos de represión mutua y con dianas comunes en la vía PI3K pero reguladas en sentido inverso. Este eje otorga un papel preponderante a cada uno de los dos integrantes según el estadio fisiopatológico de la célula. Hemos demostrado que, en el contexto neoplásico tiroideo, la desregulación de este eje, constituye un evento que contribuye a la progresión tumoral aumentando el grado de activación de la vía PI3K, la expresión de HMGA2 y de varios marcadores de transición epitelio-mesénquima.

Estos resultados, junto con los anteriormente referidos a la inactivación de PTEN por parte del miR-146b, aportan luz sobre mecanismos y circuitos de retroalimentación positiva, que median paulatinamente la creciente activación de la vía PI3K durante la carcinogénesis tiroidea. Esta activación parece ser requerida de manera concomitante a mutaciones conductoras como RAS, BRAF o p53 para la progresión tumoral hacia el carcinoma anaplásico tiroideo. Defendiendo esta idea, diversas investigaciones señalan la activación de la vía PI3K como condición necesaria para

que se dé este estadio umbral para el diagnóstico y el pronóstico en el carcinoma tiroideo (Miller, 2009; Yeager, 2007). En la misma línea, Kandel y colaboradores (Kandel, 2002) responsabilizan a la activación tumoral de la vía PI3K de promover inestabilidad genómica por incapacitar a la célula para la detención del ciclo en la transición G2/M inducido por daño en el DNA. Esta perspectiva ha sido reformulada recientemente por el mismo grupo que afirma que ningún alelo oncogenico de RAS es capaz de inducir transformación o proliferación por si sola, sino que necesita alteraciones adicionales en la activación de la vía (lesiones con alta actividad PI3K o *PI3K high lesions*) para crear un ambiente permisivo con la actividad de RAS (Antonio Cristofano, presentación oral, “Genetic Models of Thyroid Cancer “Symposium “Genetics alteration of Thyroid Cancer”, International Thyroid Meeting (TC) 2015)



## Conclusiones



## Conclusiones

1. Las dos hebras del miR-146b (3p y 5p) son las más sobreexpresadas en el carcinoma papilar tiroideo.
2. La TSH reduce la expresión del mir-146b. Por el contrario, TGF $\beta$  e IGF1 inducen la recuperación de la expresión de este miR.
3. PAX8 y miR-146b cooperan en la regulación de dianas comunes y se regulan mutuamente.
4. El miR-146b reduce la expresión de NIS a través de al menos 2 mecanismos complementarios independientes: i) a nivel postranscripcional, mediante la unión directa a su 3'UTR, y ii) a nivel transcripcional mediante el silenciamiento de PAX8 y FOXE1.
5. La sobreexpresión del miR-146b disminuye la captación de yodo.
6. El miR-146b induce la hiperactivación constitutiva de la vía PI3K/AKT a través del silenciamiento de PTEN en la célula folicular tiroidea lo que conlleva a un comportamiento tumoral más agresivo
7. LIN28B y el miR-30a se inhiben mutuamente, conformando un circuito de retroalimentación negativa doble
8. IGF1 y RAS aumentan los niveles de LIN28B, cuya expresión proteica está asociada con mutaciones activadoras de la vía PI3K en células derivadas de carcinoma anaplásico tiroideo. Por el contrario, el miR-30a es inhibido por esos efectores y su expresión está silenciada en el mismo tipo celular.
9. LIN28B y el miR-30a conforman un eje de regulación activando y reprimiendo respectivamente la expresión de HMGA2 y varios efectores de la vía PI3K. Este eje LIN28B/miR-30a controla la proliferación y la invasión en la célula folicular tiroidea.





## Bibliografía



## Bibliografia

- Acibucu, F., H. S. Dokmetas, Y. Tutar, S. Elagoz and F. Kilicli (2014). "Correlations between the expression levels of micro-RNA146b, 221, 222 and p27Kip1 protein mRNA and the clinicopathologic parameters in papillary thyroid cancers." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **122**(3): 137-143.
- Ajjan, R. A., P. F. Watson, C. Findlay, R. A. Metcalfe, M. Crisp, M. Ludgate and A. P. Weetman (1998). "The sodium iodide symporter gene and its regulation by cytokines found in autoimmunity." *J Endocrinol* **158**(3): 351-358.
- Alajez, N. M., W. Shi, D. Wong, M. Lenarduzzi, J. Waldron, I. Weinreb and F. F. Liu (2012). "Lin28b promotes head and neck cancer progression via modulation of the insulin-like growth factor survival pathway." *Oncotarget* **3**(12): 1641-1652.
- Anders, S., P. T. Pyl and W. Huber (2015). "HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data." *Bioinformatics* **31**(2): 166-169.
- Aranda, A. and A. Pascual (2001). "Nuclear hormone receptors and gene expression." *Physiol Rev* **81**(3): 1269-1304.
- Ariga, M., T. Nedachi, M. Akahori, H. Sakamoto, Y. Ito, F. Hakuno and S. Takahashi (2000). "Signalling pathways of insulin-like growth factor-I that are augmented by cAMP in FRTL-5 cells." *Biochem J* **348 Pt 2**: 409-416.
- Asa, S. L., T. J. Giordano and V. A. LiVolsi (2014). "Implications of the TCGA Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma for Thyroid Pathology: Does Follicular Variant Papillary Thyroid Carcinoma Exist?" *Thyroid*.
- Baffa, R., M. Fassan, S. Volinia, B. O'Hara, C. G. Liu, J. P. Palazzo, M. Gardiman, M. Rugge, L. G. Gomella, C. M. Croce and A. Rosenberg (2009). "MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets." *J Pathol* **219**(2): 214-221.
- Baldassarre, G., B. Belletti, M. S. Nicoloso, M. Schiappacassi, A. Vecchione, P. Spessotto, A. Morrione, V. Canzonieri and A. Colombatti (2005). "p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion." *Cancer Cell* **7**(1): 51-63.
- Belge, G., A. Meyer, M. Klemke, K. Burchardt, C. Stern, W. Wosniok, S. Loeschke and J. Bullerdiel (2008). "Upregulation of HMGA2 in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias." *Genes Chromosomes Cancer* **47**(1): 56-63.
- Benjamini, Y., D. Drai, G. Elmer, N. Kafkafi and I. Golani (2001). "Controlling the false discovery rate in behavior genetics research." *Behav Brain Res* **125**(1-2): 279-284.
- Berlingieri, M. T., G. Manfioletti, M. Santoro, A. Bandiera, R. Visconti, V. Giancotti and A. Fusco (1995). "Inhibition of HMGI-C protein synthesis suppresses retrovirally induced neoplastic transformation of rat thyroid cells." *Mol Cell Biol* **15**(3): 1545-1553.
- Bernier-Valentin, F., Z. Kostrouch, R. Rabilloud and B. Rousset (1991). "Analysis of the thyroglobulin internalization process using in vitro reconstituted thyroid follicles: evidence for a coated vesicle-dependent endocytic pathway." *Endocrinology* **129**(4): 2194-2201.
- Blancquaert, S., L. Wang, S. Paternot, K. Coulonval, J. E. Dumont, T. E. Harris and P. P. Roger (2010). "cAMP-dependent activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) in thyroid cells. Implication in mitogenesis and activation of CDK4." *Mol Endocrinol* **24**(7): 1453-1468.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braun, J., C. Hoang-Vu, H. Dralle and S. Huttelmaier (2010). "Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas." *Oncogene* **29**(29): 4237-4244.
- Braun, J. and S. Huttelmaier (2011). "Pathogenic mechanisms of deregulated microRNA expression in thyroid carcinomas of follicular origin." *Thyroid Res* **4 Suppl 1**: S1.
- Brenner-Gati, L., K. A. Berg and M. C. Gershengorn (1988). "Thyroid-stimulating hormone and insulin-like growth factor-1 synergize to elevate 1,2-diacylglycerol in rat thyroid cells. Stimulation of DNA synthesis via interaction between lipid and adenylyl cyclase signal transduction systems." *J Clin Invest* **82**(3): 1144-1148.
- Brewer, C., N. Yeager and A. Di Cristofano (2007). "Thyroid-stimulating hormone initiated proliferative signals converge in vivo on the mTOR kinase without activating AKT." *Cancer Res* **67**(17): 8002-8006.
- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96**(6): 857-868.
- Bruni, P., A. Boccia, G. Baldassarre, F. Trapasso, M. Santoro, G. Chiappetta, A. Fusco and G. Viglietto (2000). "PTEN expression is reduced in a subset of sporadic thyroid carcinomas: evidence that PTEN-growth suppressing activity in thyroid cancer cells mediated by p27kip1." *Oncogene* **19**(28): 3146-3155.
- Budd, W. T., D. E. Weaver, J. Anderson and Z. E. Zehner (2012). "microRNA dysregulation in prostate cancer: network analysis reveals preferential regulation of highly connected nodes." *Chem Biodivers* **9**(5): 857-867.
- Burger, M. L., L. Xue, Y. Sun, C. Kang and A. Winoto (2014). "Premalignant PTEN-deficient thymocytes activate microRNAs miR-146a and miR-146b as a cellular defense against malignant transformation." *Blood* **123**(26): 4089-4100.
- Burikhanov, R., K. Coulonval, I. Pirson, F. Lamy, J. E. Dumont and P. P. Roger (1996). "Thyrotropin via cyclic AMP induces insulin receptor expression and insulin Co-stimulation of growth and amplifies insulin and insulin-like growth factor signaling pathways in dog thyroid epithelial cells." *J Biol Chem* **271**(46): 29400-29406.
- Bussing, I., F. J. Slack and H. Grosshans (2008). "let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer." *Trends Mol Med* **14**(9): 400-409.
- Calebiro, D., T. de Filippis, S. Lucchi, F. Martinez, P. Porazzi, R. Trivellato, M. Locati, P. Beck-Peccoz and L. Persani (2006). "Selective modulation of protein kinase A I and II reveals distinct roles in thyroid cell gene expression and growth." *Mol Endocrinol* **20**(12): 3196-3211.
- Calebiro, D., V. O. Nikolaev, M. C. Gagliani, T. de Filippis, C. Dees, C. Tacchetti, L. Persani and M. J. Lohse (2009). "Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors." *PLoS Biol* **7**(8): e1000172.
- Calnan, D. R. and A. Brunet (2008). "The FoxO code." *Oncogene* **27**(16): 2276-2288.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address, g. u. e. and N. Cancer Genome Atlas Research (2014). "Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma." *Cell* **159**(3): 676-690.
- Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch and

- J. C. Reed (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." *Science* **282**(5392): 1318-1321.
- Cass, L. A., S. A. Summers, G. V. Prendergast, J. M. Backer, M. J. Birnbaum and J. L. Meinkoth (1999). "Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation." *Mol Cell Biol* **19**(9): 5882-5891.
- Chan, T. O., S. E. Rittenhouse and P. N. Tsichlis (1999). "AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation." *Annu Rev Biochem* **68**: 965-1014.
- Chang, H. M., R. Triboulet, J. E. Thornton and R. I. Gregory (2013). "A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis3l2 in the Lin28-let-7 pathway." *Nature* **497**(7448): 244-248.
- Chou, C. K., K. D. Yang, F. F. Chou, C. C. Huang, Y. W. Lan, Y. F. Lee, H. Y. Kang and R. T. Liu (2013). "Prognostic implications of miR-146b expression and its functional role in papillary thyroid carcinoma." *J Clin Endocrinol Metab* **98**(2): E196-205.
- Christophe-Hobertus, C., A. Lefort, F. Libert and D. Christophe (2012). "Functional inactivation of thyroid transcription factor-1 in PCC13 thyroid cells." *Mol Cell Endocrinol* **358**(1): 36-45.
- Chrivia, J. C., R. P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M. R. Montminy and R. H. Goodman (1993). "Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP." *Nature* **365**(6449): 855-859.
- Chudova, D., J. I. Wilde, E. T. Wang, H. Wang, N. Rabbee, C. M. Egidio, J. Reynolds, E. Tom, M. Pagan, C. T. Rigl, L. Friedman, C. C. Wang, R. B. Lanman, M. Zeiger, E. Kebebew, J. Rosai, G. Fellegara, V. A. LiVolsi and G. C. Kennedy (2010). "Molecular classification of thyroid nodules using high-dimensionality genomic data." *J Clin Endocrinol Metab* **95**(12): 5296-5304.
- Civitareale, D., M. P. Castelli, P. Falasca and A. Saiardi (1993). "Thyroid transcription factor 1 activates the promoter of the thyrotropin receptor gene." *Mol Endocrinol* **7**(12): 1589-1595.
- Clement, S., S. Refetoff, B. Robaye, J. E. Dumont and S. Schurmans (2001). "Low TSH requirement and goiter in transgenic mice overexpressing IGF-I and IGF-Ir receptor in the thyroid gland." *Endocrinology* **142**(12): 5131-5139.
- Colamaio, M., G. Cali, D. Sarnataro, E. Borbone, P. Pallante, M. Decaussin-Petrucci, L. Nitsch, C. M. Croce, S. Battista and A. Fusco (2012). "Let-7a down-regulation plays a role in thyroid neoplasias of follicular histotype affecting cell adhesion and migration through its ability to target the FXYD5 (Dysadherin) gene." *J Clin Endocrinol Metab* **97**(11): E2168-2178.
- Costamagna, E., B. Garcia and P. Santisteban (2004). "The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-beta repression of the sodium/iodide symporter gene." *J Biol Chem* **279**(5): 3439-3446.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich and B. A. Hemmings (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." *Nature* **378**(6559): 785-789.
- D'Andrea, B., R. Iacone, T. Di Palma, R. Nitsch, M. G. Baratta, L. Nitsch, R. Di Lauro and M. Zannini (2006). "Functional inactivation of the transcription factor Pax8 through oligomerization chain reaction." *Mol Endocrinol* **20**(8): 1810-1824.
- Dahia, P. L. (2000). "PTEN, a unique tumor suppressor gene." *Endocr Relat Cancer* **7**(2): 115-129.
- Dahia, P. L., D. J. Marsh, Z. Zheng, J. Zedenius, P. Komminoth, T. Frisk, G. Wallin, R. Parsons, M. Longy, C. Larsson and C. Eng (1997). "Somatic deletions and mutations in the Cowden

- disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors." *Cancer Res* **57**(21): 4710-4713.
- Dai, G., O. Levy and N. Carrasco (1996). "Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter." *Nature* **379**(6564): 458-460.
- De Craene, B. and G. Berx (2013). "Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression." *Nat Rev Cancer* **13**(2): 97-110.
- De Deken, X., D. Wang, J. E. Dumont and F. Miot (2002). "Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system." *Exp Cell Res* **273**(2): 187-196.
- De Felice, M. and R. Di Lauro (2004). "Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms." *Endocr Rev* **25**(5): 722-746.
- De Felice, M., M. P. Postiglione and R. Di Lauro (2004). "Minireview: thyrotropin receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland: insights from mouse models and human diseases." *Endocrinology* **145**(9): 4062-4067.
- De Gregorio, G., A. Coppa, C. Cosentino, S. Ucci, S. Messina, A. Nicolussi, S. D'Inzeo, A. Di Pardo, E. V. Avvedimento and A. Porcellini (2007). "The p85 regulatory subunit of PI3K mediates TSH-cAMP-PKA growth and survival signals." *Oncogene* **26**(14): 2039-2047.
- De la Vieja, A., C. S. Ginter and N. Carrasco (2005). "Molecular analysis of a congenital iodide transport defect: G543E impairs maturation and trafficking of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter." *Mol Endocrinol* **19**(11): 2847-2858.
- Degroot, L. J. and H. Niepomniszcze (1977). "Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects." *Metabolism* **26**(6): 665-718.
- Deng, X., B. Wu, K. Xiao, J. Kang, J. Xie, X. Zhang and Y. Fan (2015). "MiR-146b-5p promotes metastasis and induces epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancer by targeting ZNRF3." *Cell Physiol Biochem* **35**(1): 71-82.
- Dere, W. H. and B. Rapoport (1986). "Control of growth in cultured rat thyroid cells." *Mol Cell Endocrinol* **44**(3): 195-199.
- Dettmer, M., A. Perren, H. Moch, P. Komminoth, Y. E. Nikiforov and M. N. Nikiforova (2013). "Comprehensive MicroRNA expression profiling identifies novel markers in follicular variant of papillary thyroid carcinoma." *Thyroid* **23**(11): 1383-1389.
- Devlin, M. A., S. Das, I. Singh, S. Bourgoïn, D. N. Brindley and J. Ginsberg (2000). "The characterization of phospholipase D in FRTL-5 thyroid cells." *Mol Cell Endocrinol* **167**(1-2): 107-115.
- Di Palma, T., A. Conti, T. de Cristofaro, S. Scala, L. Nitsch and M. Zannini (2011). "Identification of novel Pax8 targets in FRTL-5 thyroid cells by gene silencing and expression microarray analysis." *PLoS One* **6**(9): e25162.
- Di Palma, T., M. G. Filippone, G. M. Pierantoni, A. Fusco, S. Soddu and M. Zannini (2013). "Pax8 has a critical role in epithelial cell survival and proliferation." *Cell Death Dis* **4**: e729.
- Di Palma, T., R. Nitsch, A. Mascia, L. Nitsch, R. Di Lauro and M. Zannini (2003). "The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription." *J Biol Chem* **278**(5): 3395-3402.
- Diaz-Lopez, A., G. Moreno-Bueno and A. Cano (2014). "Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives." *Cancer Manag Res* **6**: 205-216.
- Du, K. and M. Montminy (1998). "CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB." *J Biol Chem* **273**(49): 32377-32379.

- Du, P., L. Wang, P. Sliz and R. I. Gregory (2015). "A Biogenesis Step Upstream of Microprocessor Controls miR-17 approximately 92 Expression." *Cell* **162**(4): 885-899.
- Eguchi, T., K. Watanabe, E. S. Hara, M. Ono, T. Kuboki and S. K. Calderwood (2013). "OstemiR: a novel panel of microRNA biomarkers in osteoblastic and osteocytic differentiation from mesenchymal stem cells." *PLoS One* **8**(3): e58796.
- Elisei, R. and A. Pinchera (2012). "Advances in the follow-up of differentiated or medullary thyroid cancer." *Nat Rev Endocrinol* **8**(8): 466-475.
- Endo, T., M. Kaneshige, M. Nakazato, M. Ohmori, N. Harii and T. Onaya (1997). "Thyroid transcription factor-1 activates the promoter activity of rat thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene." *Mol Endocrinol* **11**(11): 1747-1755.
- Espinoza, C. R., T. L. Schmitt and U. Loos (2001). "Thyroid transcription factor 1 and Pax8 synergistically activate the promoter of the human thyroglobulin gene." *J Mol Endocrinol* **27**(1): 59-67.
- Espósito, F., M. Tornincasa, P. Pallante, A. Federico, E. Borbone, G. M. Pierantoni and A. Fusco (2012). "Down-regulation of the miR-25 and miR-30d contributes to the development of anaplastic thyroid carcinoma targeting the polycomb protein EZH2." *J Clin Endocrinol Metab* **97**(5): E710-718.
- Esquela-Kerscher, A. and F. J. Slack (2006). "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(4): 259-269.
- Fagin, J. A., K. Matsuo, A. Karmakar, D. L. Chen, S. H. Tang and H. P. Koeffler (1993). "High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas." *J Clin Invest* **91**(1): 179-184.
- Fernandez, L. P., A. Lopez-Marquez, A. M. Martinez, G. Gomez-Lopez and P. Santisteban (2013). "New insights into FoxE1 functions: identification of direct FoxE1 targets in thyroid cells." *PLoS One* **8**(5): e62849.
- Fernandez, L. P., A. Lopez-Marquez and P. Santisteban (2014). "Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease." *Nat Rev Endocrinol*.
- Frisk, T., T. Foukakis, T. Dwight, J. Lundberg, A. Hoog, G. Wallin, C. Eng, J. Zedenius and C. Larsson (2002). "Silencing of the PTEN tumor-suppressor gene in anaplastic thyroid cancer." *Genes Chromosomes Cancer* **35**(1): 74-80.
- Fujimoto, J. and L. Brenner-Gati (1992). "Protein kinase-C activation during thyrotropin-stimulated proliferation of rat FRTL-5 thyroid cells." *Endocrinology* **130**(3): 1587-1592.
- Fukushima, T., T. Nedachi, H. Akizawa, M. Akahori, F. Hakuno and S. Takahashi (2008). "Distinct modes of activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate or insulin-like growth factor I play different roles in regulation of cyclin D1 and p27Kip1 in FRTL-5 cells." *Endocrinology* **149**(7): 3729-3742.
- Fusco, A., M. T. Berlingieri, P. P. Di Fiore, G. Portella, M. Grieco and G. Vecchio (1987). "One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes." *Mol Cell Biol* **7**(9): 3365-3370.
- Garcia, B. and P. Santisteban (2002). "PI3K is involved in the IGF-I inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression." *Mol Endocrinol* **16**(2): 342-352.
- Garcia-Rostan, G., R. L. Camp, A. Herrero, M. L. Carcangiu, D. L. Rimm and G. Tallini (2001). "Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and

- poor prognosis." *Am J Pathol* **158**(3): 987-996.
- Garcia-Rostan, G., A. M. Costa, I. Pereira-Castro, G. Salvatore, R. Hernandez, M. J. Hermsem, A. Herrero, A. Fusco, J. Cameselle-Teijeiro and M. Santoro (2005). "Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer." *Cancer Res* **65**(22): 10199-10207.
- Garcia-Rostan, G., G. Tallini, A. Herrero, T. G. D'Aquila, M. L. Carcangiu and D. L. Rimm (1999). "Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma." *Cancer Res* **59**(8): 1811-1815.
- Geraldo, M. V., A. S. Yamashita and E. T. Kimura (2012). "MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF-beta by repressing SMAD4 in thyroid cancer." *Oncogene* **31**(15): 1910-1922.
- Giordano, T. J. (2014). "The cancer genome atlas research network: a sight to behold." *Endocr Pathol* **25**(4): 362-365.
- Giulietti, A., L. Overbergh, D. Valckx, B. Decallonne, R. Bouillon and C. Mathieu (2001). "An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression." *Methods* **25**(4): 386-401.
- Graham, M. E., R. D. Hart, S. Douglas, F. M. Makki, D. Pinto, A. L. Butler, M. Bullock, M. H. Rigby, J. R. Trites, S. M. Taylor and R. Singh (2015). "Serum microRNA profiling to distinguish papillary thyroid cancer from benign thyroid masses." *J Otolaryngol Head Neck Surg* **44**: 33.
- Grimson, A., K. K. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engle, L. P. Lim and D. P. Bartel (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." *Mol Cell* **27**(1): 91-105.
- Guigon, C. J., L. Zhao, M. C. Willingham and S. Y. Cheng (2009). "PTEN deficiency accelerates tumour progression in a mouse model of thyroid cancer." *Oncogene* **28**(4): 509-517.
- Hagan, J. P., E. Piskounova and R. I. Gregory (2009). "Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells." *Nat Struct Mol Biol* **16**(10): 1021-1025.
- Halachmi, N., S. Halachmi, E. Evron, P. Cairns, K. Okami, M. Saji, W. H. Westra, M. A. Zeiger, J. Jen and D. Sidransky (1998). "Somatic mutations of the PTEN tumor suppressor gene in sporadic follicular thyroid tumors." *Genes Chromosomes Cancer* **23**(3): 239-243.
- Hardin, H., Z. Guo, W. Shan, C. Montemayor-Garcia, S. Asioli, X. M. Yu, A. D. Harrison, H. Chen and R. V. Lloyd (2014). "The roles of the epithelial-mesenchymal transition marker PRRX1 and miR-146b-5p in papillary thyroid carcinoma progression." *Am J Pathol* **184**(8): 2342-2354.
- Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." *Genes Dev* **18**(16): 1926-1945.
- Helwak, A., G. Kudla, T. Dudnakova and D. Tollervy (2013). "Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding." *Cell* **153**(3): 654-665.
- Herranz, H. and S. M. Cohen (2010). "MicroRNAs and gene regulatory networks: managing the impact of noise in biological systems." *Genes Dev* **24**(13): 1339-1344.
- Hobert, O. (2004). "Common logic of transcription factor and microRNA action." *Trends Biochem Sci* **29**(9): 462-468.
- Hou, J., L. Lin, W. Zhou, Z. Wang, G. Ding, Q. Dong, L. Qin, X. Wu, Y. Zheng, Y. Yang, W. Tian, Q. Zhang, C. Wang, Q. Zhang, S. M. Zhuang, L. Zheng, A. Liang, W. Tao and X. Cao



- (2011). "Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma." *Cancer Cell* **19**(2): 232-243.
- Huang, C. T., Y. J. Oyang, H. C. Huang and H. F. Juan (2014). "MicroRNA-mediated networks underlie immune response regulation in papillary thyroid carcinoma." *Sci Rep* **4**: 6495.
- Hutti, J. E., A. D. Pfefferle, S. C. Russell, M. Sircar, C. M. Perou and A. S. Baldwin (2012). "Oncogenic PI3K mutations lead to NF-kappaB-dependent cytokine expression following growth factor deprivation." *Cancer Res* **72**(13): 3260-3269.
- Iliopoulos, D., H. A. Hirsch and K. Struhl (2009). "An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation." *Cell* **139**(4): 693-706.
- Jazdzewski, K., S. Liyanarachchi, M. Swierniak, J. Pachucki, M. D. Ringel, B. Jarzab and A. de la Chapelle (2009). "Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(5): 1502-1505.
- Jiang, W., J. Liu, Y. Dai, N. Zhou, C. Ji and X. Li (2015). "MiR-146b attenuates high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in mice." *J Gastroenterol Hepatol* **30**(5): 933-943.
- Kambe, F., Y. Nomura, T. Okamoto and H. Seo (1996). "Redox regulation of thyroid-transcription factors, Pax-8 and TTF-1, is involved in their increased DNA-binding activities by thyrotropin in rat thyroid FRTL-5 cells." *Mol Endocrinol* **10**(7): 801-812.
- Kameda, Y., T. Nishimaki, O. Chisaka, S. Iseki and H. M. Sucov (2007). "Expression of the epithelial marker E-cadherin by thyroid C cells and their precursors during murine development." *J Histochem Cytochem* **55**(10): 1075-1088.
- Kandel, E. S., J. Skeen, N. Majewski, A. Di Cristofano, P. P. Pandolfi, C. S. Feliciano, A. Gartel and N. Hay (2002). "Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage." *Mol Cell Biol* **22**(22): 7831-7841.
- Kane, L. P., V. S. Shapiro, D. Stokoe and A. Weiss (1999). "Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase." *Curr Biol* **9**(11): 601-604.
- Khvorova, A., A. Reynolds and S. D. Jayasena (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." *Cell* **115**(2): 209-216.
- Kim, J. H., S. W. Kim, P. J. Jung, C. Yon, S. C. Kim and J. S. Han (2002). "Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and RhoA are involved in the thyrotropin-induced activation of phospholipase D in FRTL-5 thyroid cells." *Mol Cells* **14**(2): 272-280.
- Kimura, T., J. E. Dumont, A. Fusco and J. Golstein (1999). "Insulin and TSH promote growth in size of PC Cl3 rat thyroid cells, possibly via a pathway different from DNA synthesis: comparison with FRTL-5 cells." *Eur J Endocrinol* **140**(1): 94-103.
- Kimura, T., A. Van Keymeulen, J. Golstein, A. Fusco, J. E. Dumont and P. P. Roger (2001). "Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models." *Endocr Rev* **22**(5): 631-656.
- Klemke, M., M. H. Muller, W. Wosniok, D. N. Markowski, R. Nimzyk, B. M. Helmke and J. Bullerdiel (2014). "Correlated expression of HMGA2 and PLAG1 in thyroid tumors, uterine leiomyomas and experimental models." *PLoS One* **9**(2): e88126.
- Krol, J., I. Loedige and W. Filipowicz (2010). "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay." *Nat Rev Genet* **11**(9): 597-610.
- Krol, J., K. Sobczak, U. Wilczynska, M. Drath, A. Jasinska, D. Kaczynska and W. J. Krzyzosiak

- (2004). "Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design." *J Biol Chem* **279**(40): 42230-42239.
- Kumarswamy, R., G. Mudduluru, P. Ceppi, S. Muppala, M. Kozlowski, J. Niklinski, M. Papotti and H. Allgayer (2012). "MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snail and is downregulated in non-small cell lung cancer." *Int J Cancer* **130**(9): 2044-2053.
- Kupperman, E., W. Wen and J. L. Meinkoth (1993). "Inhibition of thyrotropin-stimulated DNA synthesis by microinjection of inhibitors of cellular Ras and cyclic AMP-dependent protein kinase." *Mol Cell Biol* **13**(8): 4477-4484.
- Kwok, R. P., J. R. Lundblad, J. C. Chrivia, J. P. Richards, H. P. Bachinger, R. G. Brennan, S. G. Roberts, M. R. Green and R. H. Goodman (1994). "Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB." *Nature* **370**(6486): 223-226.
- Lakshmanan, A., A. Wojcicka, M. Kotlarek, X. Zhang, K. Jazdzewski and S. Jhiang (2014). "microRNA-339-5p modulates Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter-mediated radioiodide uptake." *Endocr Relat Cancer*.
- Langmead, B., C. Trapnell, M. Pop and S. L. Salzberg (2009). "Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome." *Genome Biol* **10**(3): R25.
- Larrea, M. D., S. A. Wander and J. M. Slingerland (2009). "p27 as Jekyll and Hyde: regulation of cell cycle and cell motility." *Cell Cycle* **8**(21): 3455-3461.
- Lazzaro, D., M. Price, M. de Felice and R. Di Lauro (1991). "The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain." *Development* **113**(4): 1093-1104.
- Ledent, C., J. E. Dumont, G. Vassart and M. Parmentier (1992). "Thyroid expression of an A2 adenosine receptor transgene induces thyroid hyperplasia and hyperthyroidism." *EMBO J* **11**(2): 537-542.
- Lee, J. C., J. T. Zhao, R. J. Clifton-Bligh, A. Gill, J. S. Gundara, J. C. Ip, A. Glover, M. S. Sywak, L. W. Delbridge, B. G. Robinson and S. B. Sidhu (2013). "MicroRNA-222 and microRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer." *Cancer* **119**(24): 4358-4365.
- Lemoine, N. R., E. S. Mayall, T. Jones, D. Sheer, S. McDermid, P. Kendall-Taylor and D. Wynford-Thomas (1989). "Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised in vitro by simian virus 40 DNA transfection." *Br J Cancer* **60**(6): 897-903.
- Leone, V., D. D'Angelo, A. Ferraro, P. Pallante, I. Rubio, M. Santoro, C. M. Croce and A. Fusco (2011). "A TSH-CREB1-microRNA loop is required for thyroid cell growth." *Mol Endocrinol* **25**(10): 1819-1830.
- Lewis, A. E., A. J. Fikaris, G. V. Prendergast and J. L. Meinkoth (2004). "Thyrotropin and serum regulate thyroid cell proliferation through differential effects on p27 expression and localization." *Mol Endocrinol* **18**(9): 2321-2332.
- Liang, H. and W. H. Li (2007). "MicroRNA regulation of human protein protein interaction network." *RNA* **13**(9): 1402-1408.
- Liang, J., J. Zubovitz, T. Petrocelli, R. Kotchetkov, M. K. Connor, K. Han, J. H. Lee, S. Ciarallo, C. Catzavelos, R. Beniston, E. Franssen and J. M. Slingerland (2002). "PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest." *Nat*

- Med **8**(10): 1153-1160.
- Lin, S. and R. I. Gregory (2015). "MicroRNA biogenesis pathways in cancer." *Nat Rev Cancer* **15**(6): 321-333.
- Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz and T. R. Golub (2005). "MicroRNA expression profiles classify human cancers." *Nature* **435**(7043): 834-838.
- Ma, X., C. Li, L. Sun, D. Huang, T. Li, X. He, G. Wu, Z. Yang, X. Zhong, L. Song, P. Gao and H. Zhang (2014). "Lin28/let-7 axis regulates aerobic glycolysis and cancer progression via PDK1." *Nat Commun* **5**: 5212.
- Mansouri, A., K. Chowdhury and P. Gruss (1998). "Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function." *Nat Genet* **19**(1): 87-90.
- Marians, R. C., L. Ng, H. C. Blair, P. Unger, P. N. Graves and T. F. Davies (2002). "Defining thyrotropin-dependent and -independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor-null mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15776-15781.
- Marotta, P., E. Amendola, M. Scarfo, P. De Luca, P. Zoppoli, A. Amoresano, M. De Felice and R. Di Lauro (2014). "The paired box transcription factor Pax8 is essential for function and survival of adult thyroid cells." *Mol Cell Endocrinol* **396**(1-2): 26-36.
- Martinez, N. J., M. C. Ow, M. I. Barrasa, M. Hammell, R. Sequerra, L. Doucette-Stamm, F. P. Roth, V. R. Ambros and A. J. Walhout (2008). "A *C. elegans* genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity." *Genes Dev* **22**(18): 2535-2549.
- Martinez, N. J. and A. J. Walhout (2009). "The interplay between transcription factors and microRNAs in genome-scale regulatory networks." *Bioessays* **31**(4): 435-445.
- Mascia, A., L. Nitsch, R. Di Lauro and M. Zannini (2002). "Hormonal control of the transcription factor Pax8 and its role in the regulation of thyroglobulin gene expression in thyroid cells." *J Endocrinol* **172**(1): 163-176.
- Masuyama, N., K. Oishi, Y. Mori, T. Ueno, Y. Takahama and Y. Gotoh (2001). "Akt inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T-cell apoptosis." *J Biol Chem* **276**(35): 32799-32805.
- McClelland, A. D., M. Herman-Edelstein, R. Komers, J. C. Jha, C. E. Winbanks, S. Hagiwara, P. Gregorevic, P. Kantharidis and M. E. Cooper (2015). "miR-21 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by targeting PTEN and SMAD7." *Clin Sci (Lond)*.
- Medina, D. L. and P. Santisteban (2000). "Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems." *Eur J Endocrinol* **143**(2): 161-178.
- Medina, D. L., K. Suzuki, M. Pietrarelli, F. Okajima, L. D. Kohn and P. Santisteban (2000). "Role of insulin and serum on thyrotropin regulation of thyroid transcription factor-1 and pax-8 genes expression in FRTL-5 thyroid cells." *Thyroid* **10**(4): 295-303.
- Medina, D. L., M. J. Toro and P. Santisteban (2000). "Somatostatin interferes with thyrotropin-induced G1-S transition mediated by cAMP-dependent protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. Involvement of RhoA and cyclin E x cyclin-dependent kinase 2 complexes." *J Biol Chem* **275**(20): 15549-15556.
- Miller, K. A., N. Yeager, K. Baker, X. H. Liao, S. Refetoff and A. Di Cristofano (2009). "Oncogenic Kras requires simultaneous PI3K signaling to induce ERK activation and transform thyroid epithelial cells in vivo." *Cancer Res* **69**(8): 3689-3694.
- Morin, R. D., M. D. O'Connor, M. Griffith, F. Kuchenbauer, A. Delaney, A. L. Prabhu, Y. Zhao,

- H. McDonald, T. Zeng, M. Hirst, C. J. Eaves and M. A. Marra (2008). "Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells." *Genome Res* **18**(4): 610-621.
- Muller, K., D. Fuhrer, J. Mittag, N. Kloting, M. Bluher, R. E. Weiss, M. C. Many, K. W. Schmid and K. Krohn (2011). "TSH compensates thyroid-specific IGF-I receptor knockout and causes papillary thyroid hyperplasia." *Mol Endocrinol* **25**(11): 1867-1879.
- Mullokandov, G., A. Baccarini, A. Ruzo, A. D. Jayaprakash, N. Tung, B. Israelow, M. J. Evans, R. Sachidanandam and B. D. Brown (2012). "High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries." *Nat Methods* **9**(8): 840-846.
- Nellore, A., K. Paziana, C. Ma, O. M. Tsygankova, Y. Wang, K. Puttaswamy, A. U. Iqbal, S. R. Franks, Y. Lv, A. B. Troxel, M. D. Feldman, J. L. Meinkoth and M. S. Brose (2009). "Loss of Rap1GAP in papillary thyroid cancer." *J Clin Endocrinol Metab* **94**(3): 1026-1032.
- Nguyen, L. Q., P. Kopp, F. Martinson, K. Stanfield, S. I. Roth and J. L. Jameson (2000). "A dominant negative CREB (cAMP response element-binding protein) isoform inhibits thyrocyte growth, thyroid-specific gene expression, differentiation, and function." *Mol Endocrinol* **14**(9): 1448-1461.
- Nieto, M. A. (2013). "Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells." *Science* **342**(6159): 1234850.
- Nieto, M. A. and A. Cano (2012). "The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity." *Semin Cancer Biol* **22**(5-6): 361-368.
- Nikiforov, Y. E. and M. N. Nikiforova (2011). "Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer." *Nat Rev Endocrinol* **7**(10): 569-580.
- Nikiforov Y E, Biddinger PW, Thomson L D R, *Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid: A comprehensive guide for practicing thyroid pathology* . Ed. Lippincott Williams and Wilkins (2001).
- Nikiforova, M. N., G. C. Tseng, D. Steward, D. Diorio and Y. E. Nikiforov (2008). "MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility." *J Clin Endocrinol Metab* **93**(5): 1600-1608.
- Nikiforova, M. N., A. I. Wald, S. Roy, M. B. Durso and Y. E. Nikiforov (2013). "Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer." *J Clin Endocrinol Metab* **98**(11): E1852-1860.
- Nitsch, R., V. Di Dato, A. di Gennaro, T. de Cristofaro, S. Abbondante, M. De Felice, M. Zannini and R. Di Lauro (2010). "Comparative genomics reveals a functional thyroid-specific element in the far upstream region of the PAX8 gene." *BMC Genomics* **11**: 306.
- Ocana, O. H., R. Corcoles, A. Fabra, G. Moreno-Bueno, H. Acloque, S. Vega, A. Barrallo-Gimeno, A. Cano and M. A. Nieto (2012). "Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1." *Cancer Cell* **22**(6): 709-724.
- Ock, S., S. H. Lee, J. Ahn, T. J. Lee, C. H. Cho, E. D. Abel, S. Kimura and J. Kim (2011). "Conditional deletion of insulin receptor in thyrocytes does not affect thyroid structure and function." *Endocr J* **58**(11): 1013-1019.
- Ohno, M., M. Zannini, O. Levy, N. Carrasco and R. di Lauro (1999). "The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription." *Mol Cell Biol* **19**(3): 2051-2060.

- Ortiz, L., M. Zannini, R. Di Lauro and P. Santisteban (1997). "Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I." *J Biol Chem* **272**(37): 23334-23339.
- Ozes, O. N., L. D. Mayo, J. A. Gustin, S. R. Pfeffer, L. M. Pfeffer and D. B. Donner (1999). "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase." *Nature* **401**(6748): 82-85.
- Paes, J. E. and M. D. Ringel (2008). "Dysregulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in thyroid neoplasia." *Endocrinol Metab Clin North Am* **37**(2): 375-387, viii-ix.
- Pallante, P., S. Battista, G. M. Pierantoni and A. Fusco (2014). "Deregulation of microRNA expression in thyroid neoplasias." *Nat Rev Endocrinol* **10**(2): 88-101.
- Pallante, P., R. Sepe, F. Puca and A. Fusco (2015). "High mobility group a proteins as tumor markers." *Front Med (Lausanne)* **2**: 15.
- Pallante, P., R. Visone, M. Ferracin, A. Ferraro, M. T. Berlingieri, G. Troncone, G. Chiappetta, C. G. Liu, M. Santoro, M. Negrini, C. M. Croce and A. Fusco (2006). "MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas." *Endocr Relat Cancer* **13**(2): 497-508.
- Paraskevopoulou, M. D., G. Georgakilas, N. Kostoulas, I. S. Vlachos, T. Vergoulis, M. Reczko, C. Filippidis, T. Dalamagas and A. G. Hatzigeorgiou (2013). "DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows." *Nucleic Acids Res* **41**(Web Server issue): W169-173.
- Park, Y. J., E. S. Park, M. S. Kim, T. Y. Kim, H. S. Lee, S. Lee, I. S. Jang, M. Shong, D. J. Park and B. Y. Cho (2002). "Involvement of the protein kinase C pathway in thyrotropin-induced STAT3 activation in FRTL-5 thyroid cells." *Mol Cell Endocrinol* **194**(1-2): 77-84.
- Parlato, R., A. Rosica, A. Rodriguez-Mallon, A. Affuso, M. P. Postiglione, C. Arra, A. Mansouri, S. Kimura, R. Di Lauro and M. De Felice (2004). "An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis." *Dev Biol* **276**(2): 464-475.
- Pasca di Magliano, M., R. Di Lauro and M. Zannini (2000). "Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13144-13149.
- Pascual, A. and A. Aranda (2013). "Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation." *Biochim Biophys Acta* **1830**(7): 3908-3916.
- Paternot, S., J. E. Dumont and P. P. Roger (2006). "Differential utilization of cyclin D1 and cyclin D3 in the distinct mitogenic stimulations by growth factors and TSH of human thyrocytes in primary culture." *Mol Endocrinol* **20**(12): 3279-3292.
- Pekary, A. E., S. R. Levin, D. G. Johnson, L. Berg and J. M. Hershman (1997). "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) inhibit the expression and activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in FRTL-5 rat thyroid cells." *J Interferon Cytokine Res* **17**(4): 185-195.
- Phuong, N. T., S. K. Kim, J. H. Im, J. W. Yang, M. C. Choi, S. C. Lim, K. Y. Lee, Y. M. Kim, J. H. Yoon and K. W. Kang (2015). "Induction of methionine adenosyltransferase 2A in tamoxifen-resistant breast cancer cells." *Oncotarget*.
- Pirson, I., K. Coulonval, F. Lamy and J. E. Dumont (1996). "c-Myc expression is controlled by the mitogenic cAMP-cascade in thyrocytes." *J Cell Physiol* **168**(1): 59-70.
- Piskounova, E., C. Polytarchou, J. E. Thornton, R. J. LaPierre, C. Pothoulakis, J. P. Hagan, D. Iliopoulos and R. I. Gregory (2011). "Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms." *Cell* **147**(5): 1066-1079.

- Piskounova, E., S. R. Viswanathan, M. Janas, R. J. LaPierre, G. Q. Daley, P. Sliz and R. I. Gregory (2008). "Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28." *J Biol Chem* **283**(31): 21310-21314.
- Polesskaya, A., S. Cuvellier, I. Naguibneva, A. Duquet, E. G. Moss and A. Harel-Bellan (2007). "Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency." *Genes Dev* **21**(9): 1125-1138.
- Polyak, K. and R. A. Weinberg (2009). "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits." *Nat Rev Cancer* **9**(4): 265-273.
- Postiglione, M. P., R. Parlato, A. Rodriguez-Mallon, A. Rosica, P. Mithbaokar, M. Maresca, R. C. Marians, T. F. Davies, M. S. Zannini, M. De Felice and R. Di Lauro (2002). "Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15462-15467.
- Puppin, C., I. Presta, A. V. D'Elia, G. Tell, F. Arturi, D. Russo, S. Filetti and G. Damante (2004). "Functional interaction among thyroid-specific transcription factors: Pax8 regulates the activity of Hex promoter." *Mol Cell Endocrinol* **214**(1-2): 117-125.
- Qiu, C., Y. Ma, J. Wang, S. Peng and Y. Huang (2010). "Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells." *Nucleic Acids Res* **38**(4): 1240-1248.
- Ricarte-Filho, J. C., M. Ryder, D. A. Chitale, M. Rivera, A. Heguy, M. Ladanyi, M. Janakiraman, D. Solit, J. A. Knauf, R. M. Tuttle, R. A. Ghossein and J. A. Fagin (2009). "Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1." *Cancer Res* **69**(11): 4885-4893.
- Riedel, C., O. Levy and N. Carrasco (2001). "Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin." *J Biol Chem* **276**(24): 21458-21463.
- Riesco-Eizaguirre, G., I. Rodriguez, A. De la Vieja, E. Costamagna, N. Carrasco, M. Nistal and P. Santisteban (2009). "The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer." *Cancer Res* **69**(21): 8317-8325.
- Riesco-Eizaguirre, G. and P. Santisteban (2006). "A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications." *Eur J Endocrinol* **155**(4): 495-512.
- Riesco-Eizaguirre, G. and P. Santisteban (2007). "Molecular biology of thyroid cancer initiation." *Clin Transl Oncol* **9**(11): 686-693.
- Roger, P. P. and J. E. Dumont (1984). "Factors controlling proliferation and differentiation of canine thyroid cells cultured in reduced serum conditions: effects of thyrotropin, cyclic AMP and growth factors." *Mol Cell Endocrinol* **36**(1-2): 79-93.
- Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1999). "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." *Nature* **401**(6748): 86-90.
- Ruiz-Llorente, S., E. Carrillo Santa de Pau, A. Sastre-Perona, C. Montero-Conde, G. Gomez-Lopez, J. A. Fagin, A. Valencia, D. G. Pisano and P. Santisteban (2012). "Genome-wide analysis of Pax8 binding provides new insights into thyroid functions." *BMC Genomics* **13**: 147.
- Saiselet, M., D. Gacquer, A. Spinette, L. Craciun, M. Decaussin-Petrucci, G. Andry, V. Detours and C. Maenhaut (2015). "New global analysis of the microRNA transcriptome of primary tumors and lymph node metastases of papillary thyroid cancer." *BMC Genomics* **16**: 828.

- Saito, J., A. D. Kohn, R. A. Roth, Y. Noguchi, I. Tatsumo, A. Hirai, K. Suzuki, L. D. Kohn, M. Saji and M. D. Ringel (2001). "Regulation of FRTL-5 thyroid cell growth by phosphatidylinositol (OH) 3 kinase-dependent Akt-mediated signaling." *Thyroid* **11**(4): 339-351.
- Santarpia, L., A. K. El-Naggar, G. J. Cote, J. N. Myers and S. I. Sherman (2008). "Phosphatidylinositol 3-kinase/akt and ras/raf-mitogen-activated protein kinase pathway mutations in anaplastic thyroid cancer." *J Clin Endocrinol Metab* **93**(1): 278-284.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." *Science* **307**(5712): 1098-1101.
- Sastre-Perona, A. and P. Santisteban (2014). "Wnt-independent role of beta-catenin in thyroid cell proliferation and differentiation." *Mol Endocrinol* **28**(5): 681-695.
- Schwertheim, S., S. Y. Sheu, K. Worm, F. Grabellus and K. W. Schmid (2009). "Analysis of deregulated miRNAs is helpful to distinguish poorly differentiated thyroid carcinoma from papillary thyroid carcinoma." *Horm Metab Res* **41**(6): 475-481.
- Scott, P. H., G. J. Brunn, A. D. Kohn, R. A. Roth and J. C. Lawrence, Jr. (1998). "Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7772-7777.
- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski and T. Ideker (2003). "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks." *Genome Res* **13**(11): 2498-2504.
- Shin, I., F. M. Yakes, F. Rojo, N. Y. Shin, A. V. Bakin, J. Baselga and C. L. Arteaga (2002). "PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization." *Nat Med* **8**(10): 1145-1152.
- Shirokawa, J. M., R. Elisei, J. A. Knauf, T. Hara, J. Wang, H. I. Saavedra and J. A. Fagin (2000). "Conditional apoptosis induced by oncogenic ras in thyroid cells." *Mol Endocrinol* **14**(11): 1725-1738.
- Spitzweg, C., K. C. Bible, L. C. Hofbauer and J. C. Morris (2014). "Advanced radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer: the sodium iodide symporter and other emerging therapeutic targets." *Lancet Diabetes Endocrinol*.
- Steck, P. A., M. A. Pershouse, S. A. Jasser, W. K. Yung, H. Lin, A. H. Ligon, L. A. Langford, M. L. Baumgard, T. Hattier, T. Davis, C. Frye, R. Hu, B. Swedlund, D. H. Teng and S. V. Tavtigian (1997). "Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers." *Nat Genet* **15**(4): 356-362.
- Swierniak, M., A. Wojcicka, M. Czetwertynska, E. Stachlewska, M. Maciag, W. Wiechno, B. Gornicka, M. Bogdanska, L. Koperski, A. de la Chapelle and K. Jazdzewski (2013). "In-depth characterization of the microRNA transcriptome in normal thyroid and papillary thyroid carcinoma." *J Clin Endocrinol Metab* **98**(8): E1401-1409.
- Taki, K., T. Kogai, Y. Kanamoto, J. M. Hershman and G. A. Brent (2002). "A thyroid-specific far-upstream enhancer in the human sodium/iodide symporter gene requires Pax-8 binding and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like sequence binding proteins for full activity and is differentially regulated in normal and thyroid cancer cells." *Mol Endocrinol* **16**(10): 2266-2282.

- Tam, W. L. and R. A. Weinberg (2013). "The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer." *Nat Med* **19**(11): 1438-1449.
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang and M. A. Nieto (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." *Cell* **139**(5): 871-890.
- Thornton, J. E., H. M. Chang, E. Piskounova and R. I. Gregory (2012). "Lin28-mediated control of let-7 microRNA expression by alternative TUTases Zcchc11 (TUT4) and Zcchc6 (TUT7)." *RNA* **18**(10): 1875-1885.
- Thorwarth, A., S. Schnittert-Hubener, P. Schruppf, I. Muller, S. Jyrch, C. Dame, H. Biebermann, G. Kleinau, J. Katchanov, M. Schuelke, G. Ebert, A. Steininger, C. Bonnemann, K. Brockmann, H. J. Christen, P. Crock, F. deZegher, M. Griesse, J. Hewitt, S. Ivarsson, C. Hubner, K. Kapelari, B. Plecko, D. Rating, I. Stoeva, H. H. Ropers, A. Gruters, R. Ullmann and H. Krude (2014). "Comprehensive genotyping and clinical characterisation reveal 27 novel NKX2-1 mutations and expand the phenotypic spectrum." *J Med Genet* **51**(6): 375-387.
- Tramontano, D., W. W. Chin, A. C. Moses and S. H. Ingbar (1986). "Thyrotropin and dibutyryl cyclic AMP increase levels of c-myc and c-fos mRNAs in cultured rat thyroid cells." *J Biol Chem* **261**(9): 3919-3922.
- Tramontano, D., G. W. Cushing, A. C. Moses and S. H. Ingbar (1986). "Insulin-like growth factor-I stimulates the growth of rat thyroid cells in culture and synergizes the stimulation of DNA synthesis induced by TSH and Graves'-IgG." *Endocrinology* **119**(2): 940-942.
- Trapnell, C., L. Pachter and S. L. Salzberg (2009). "TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq." *Bioinformatics* **25**(9): 1105-1111.
- Trueba, S. S., J. Auge, G. Mattei, H. Etchevers, J. Martinovic, P. Czernichow, M. Vekemans, M. Polak and T. Attie-Bitach (2005). "PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(1): 455-462.
- Tsai, J. H., J. L. Donaher, D. A. Murphy, S. Chau and J. Yang (2012). "Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis." *Cancer Cell* **22**(6): 725-736.
- Tsang, J., J. Zhu and A. van Oudenaarden (2007). "MicroRNA-mediated feedback and feedforward loops are recurrent network motifs in mammals." *Mol Cell* **26**(5): 753-767.
- Van Keymeulen, A., J. Bartek, J. E. Dumont and P. P. Roger (1999). "Cyclin D3 accumulation and activity integrate and rank the comitogenic pathways of thyrotropin and insulin in thyrocytes in primary culture." *Oncogene* **18**(51): 7351-7359.
- Vandeput, F., S. Perpete, K. Coulonval, F. Lamy and J. E. Dumont (2003). "Role of the different mitogen-activated protein kinase subfamilies in the stimulation of dog and human thyroid epithelial cell proliferation by cyclic adenosine 5'-monophosphate and growth factors." *Endocrinology* **144**(4): 1341-1349.
- Vassart, G. and J. E. Dumont (1992). "The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth." *Endocr Rev* **13**(3): 596-611.
- Velasco, J. A., A. Acebron, M. Zannini, J. Martin-Perez, R. Di Lauro and P. Santisteban (1998). "Ha-ras interference with thyroid cell differentiation is associated with a down-regulation of thyroid transcription factor-1 phosphorylation." *Endocrinology* **139**(6): 2796-2802.
- Viglietto, G., M. L. Motti, P. Bruni, R. M. Melillo, A. D'Alessio, D. Califano, F. Vinci, G. Chiappetta, P. Tschlis, A. Bellacosa, A. Fusco and M. Santoro (2002). "Cytoplasmic



- relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer." *Nat Med* **8**(10): 1136-1144.
- Visone, R., P. Pallante, A. Vecchione, R. Cirombella, M. Ferracin, A. Ferraro, S. Volinia, S. Coluzzi, V. Leone, E. Borbone, C. G. Liu, F. Petrocca, G. Troncone, G. A. Calin, A. Scarpa, C. Colato, G. Tallini, M. Santoro, C. M. Croce and A. Fusco (2007). "Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas." *Oncogene* **26**(54): 7590-7595.
- Viswanathan, S. R. and G. Q. Daley (2010). "Lin28: A microRNA regulator with a macro role." *Cell* **140**(4): 445-449.
- Viswanathan, S. R., J. T. Powers, W. Einhorn, Y. Hoshida, T. L. Ng, S. Toffanin, M. O'Sullivan, J. Lu, L. A. Phillips, V. L. Lockhart, S. P. Shah, P. S. Tanwar, C. H. Mermel, R. Beroukhi, M. Azam, J. Teixeira, M. Meyerson, T. P. Hughes, J. M. Llovet, J. Radich, C. G. Mullighan, T. R. Golub, P. H. Sorensen and G. Q. Daley (2009). "Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies." *Nat Genet* **41**(7): 843-848.
- Vuchak, L. A., O. M. Tsygankova, G. V. Prendergast and J. L. Meinkoth (2009). "Protein kinase A and B-Raf mediate extracellular signal-regulated kinase activation by thyrotropin." *Mol Pharmacol* **76**(5): 1123-1129.
- Wang, J., M. Lu, C. Qiu and Q. Cui (2010). "TransmiR: a transcription factor-microRNA regulation database." *Nucleic Acids Res* **38**(Database issue): D119-122.
- Wilbert, M. L., S. C. Huelga, K. Kapeli, T. J. Stark, T. Y. Liang, S. X. Chen, B. Y. Yan, J. L. Nathanson, K. R. Hutt, M. T. Lovci, H. Kazan, A. Q. Vu, K. B. Massirer, Q. Morris, S. Hoon and G. W. Yeo (2012). "LIN28 binds messenger RNAs at GGAGA motifs and regulates splicing factor abundance." *Mol Cell* **48**(2): 195-206.
- Woloshin, P. I., K. M. Walton, R. P. Rehfuess, R. H. Goodman and R. D. Cone (1992). "3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulated enhancer binding (CREB) activity is required for normal growth and differentiated phenotype in the FRTL5 thyroid follicular cell line." *Mol Endocrinol* **6**(10): 1725-1733.
- Xing, M. (2010). "Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer." *Thyroid* **20**(7): 697-706.
- Xu, B., K. Zhang and Y. Huang (2009). "Lin28 modulates cell growth and associates with a subset of cell cycle regulator mRNAs in mouse embryonic stem cells." *RNA* **15**(3): 357-361.
- Yeager, N., A. Klein-Szanto, S. Kimura and A. Di Cristofano (2007). "Pten loss in the mouse thyroid causes goiter and follicular adenomas: insights into thyroid function and Cowden disease pathogenesis." *Cancer Res* **67**(3): 959-966.
- Yoshida, A., I. Hisatome, S. Taniguchi, N. Sasaki, Y. Yamamoto, J. Miake, H. Fukui, H. Shimizu, T. Okamura, T. Okura, O. Igawa, C. Shigemasa, E. D. Green, L. D. Kohn and K. Suzuki (2004). "Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin." *Endocrinology* **145**(9): 4301-4308.
- Zaballos, M. A., B. Garcia and P. Santisteban (2008). "Gbetagamma dimers released in response to thyrotropin activate phosphoinositide 3-kinase and regulate gene expression in thyroid cells." *Mol Endocrinol* **22**(5): 1183-1199.
- Zaballos, M. A. and P. Santisteban (2013). "FOXO1 controls thyroid cell proliferation in response to TSH and IGF-I and is involved in thyroid tumorigenesis." *Mol Endocrinol* **27**(1): 50-62.
- Zannini, M., H. Francis-Lang, D. Plachov and R. Di Lauro (1992). "Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and

- activates transcription from two thyroid-specific promoters." *Mol Cell Biol* **12**(9): 4230-4241.
- Zhang, Z., S. Zhang, P. Ma, Y. Jing, H. Peng, W. Q. Gao and G. Zhuang (2015). "Lin28B promotes melanoma growth by mediating a microRNA regulatory circuit." *Carcinogenesis* **36**(9): 937-945.
- Zhong, X., N. Li, S. Liang, Q. Huang, G. Coukos and L. Zhang (2010). "Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells." *J Biol Chem* **285**(53): 41961-41971.
- Zhou, G. J., M. Xiao, L. N. Zhao, J. G. Tang and L. Zhang (2015). "MicroRNAs as novel biomarkers for the differentiation of malignant versus benign thyroid lesions: a meta-analysis." *Genet Mol Res* **14**(3): 7279-7289.
- Zhu, H., N. Shyh-Chang, A. V. Segre, G. Shinoda, S. P. Shah, W. S. Einhorn, A. Takeuchi, J. M. Engreitz, J. P. Hagan, M. G. Kharas, A. Urbach, J. E. Thornton, R. Triboulet, R. I. Gregory, D. Consortium, M. Investigators, D. Altshuler and G. Q. Daley (2011). "The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism." *Cell* **147**(1): 81-94.
- Zuckier, L. S., O. Dohan, Y. Li, C. J. Chang, N. Carrasco and E. Dadachova (2004). "Kinetics of perrhenate uptake and comparative biodistribution of perrhenate, pertechnetate, and iodide by NaI symporter-expressing tissues in vivo." *J Nucl Med* **45**(3): 500-507.

## Anexo I



**Anexo I: Hipotéticos sitios de unión del factor de transcripción PAX8 en el promotor del gen que codifica por miR-146b:**

**>chromosome:Rnor\_5.0:1:273517517:273520526:1**

GCATGACTGACTTGTTCCTTATTGTCCGCTAGAGGTCCGGAACATTTCCGGCATTATTATT  
CCTGAAAGATTCCAGGATTTCCCTCCCTGCCTTATTTCCCTCGTCACCAGGAGCCCCACC  
TGGAATCCTATAGATTTCCCTTTCCCTCTTCCTTGTCTTTCCGGTCCTTCTTCAATCTCT  
GTGGGTCACCGACTGGATGTGGTGTCTCCTATTGCAAGATCTAAAGATCTCCCCCATAT  
TCCAGCATGTGTTTCGATCTGGCTTCAAGCCCTGCCACCCAGTCAGCTCTTGGGGTCTCA  
CTTCCAGGACCTTATGTGTCCCCTTTGTCCCTTATAGATGTCTTCCCAAGATTAACGTG  
GCTTACAGGGTCTTTAGCAGGTGATGAACATTAAATGCTTGAAGTGAGGATAGAAGT  
AACCCGGGTCCAAGACAGCCTGCAGATCCTCTGCAGCCACAGTGTCTCTTGCCTACG  
CTGGCAGGGCTAATAATCTAGAAGAGACAGGGCAGCTATACACCAGGACCCAGTAAG  
TAAGTCCTCAGCTTCTGCTTTCTCTTCCCTGCTACCTCAGCTTCCCCACACTGCTCCTCAC  
CATAGGCTCCCTCCTCCCCAACAGGGTGGGTGACTGCTGAGAAGGAGAAGGAAGGAG  
GAGAGGGAGGGGCAGGCTTGGCTTCTCCCATAAAAGTACTGTTGCTGCCAGACTGGCG  
CTGTGAGGGTTAATAAGAGGTAGGTGACAGCCACTTTGAACTCTTGCCAAGCAGGCCT  
CTGGAAAGGAACCAATGGTCTCCCCCATCAGCCCCAGGCTCCTGCCTGCTCTCCCTTCT  
GGGTCCCCTTTCCCCCTCCCCTTTACCCATTGCACAATACAGATGACTGTTTATTCCTTA  
CCACCCCCATTCCCGGAACCTACAGGTTTCCCTCAGCAGAGCTGCCTCTTGTCTAACCC  
AGACCCCTGCATACCCAAGGCTCTACCCTTCCCTCTCCCATCTC**CCATTCTTGCATGGT**  
**TTG**CTACTGGGTGTAGCTAGATAGCAGAAAAGATAACCCTGAACTCTCAGGGAATAA  
CAATGCCAAAGATTTCTAGGGGGAACCTTCTCTATTCTAACTCAGACTCTGGGGAGAC  
CTAACTCTGTGCAGCTGGAGTCAGGTTCTGGGGCCTCAGAACAGAATGTGGGCAGAGG  
GAAGGAAGTGTACAGACTAAAATGTCAGGTAGCACTTCCATGAATCTCTAAAATGGT  
GGTCTTAAACCTTCCAAAGGCTCAGGCCCTTTAATACAGTCCCTTGTGTTATGGTTACC  
CCCGACCATAAAGTTATTTTACTACTACTTCATGAGTGTAATTTTTATTGTTACGAATC  
ACATTGTAGGGGTTGGGGATTTAGCTCAGTGGTAGAACACTCGCCTAGCAAGCGCAAG  
GCCCTGGGTTCGTCCTCAGCTCTAAAAAAAACGAATCACATTGTAAATGTCTGTGTT  
TTCTGATGGTCTTAGGTGACCCCAATGAAAGGGCCCTTTGATTCTCAAGGGGTTTGCGA  
CCAACAGGTTGAGAACCATTGCTCCAGAAAACCATCTGTTAGATATACACAGCTAATG  
TGGCCTTGCCCTTAGTTCCTGGTTTCCGGTCCCCTAAATTCTTATTTTCTCTCCTTCCCC  
AAGGTGGGAGCCAACTTCACTGAGTACTGCTTCAAGCCCCTGTAAGGAAGGCAAGTGT  
TGCTTGCCTCTTCTCTCCTCTTCCCTTAGGTGACTTTTGTAGGCTGCAGGGTATCCTCGA  
CTGAAAAAGACTAGGAGCCTATG**CTGTAAATAAC**TCTGACTTATAATTCCCCAGGCCC  
CTGTCTCAGAAGCTGGAATTGGGGTTGAGTTCAGCATCAAGAGGTTCCCGGCATTAGA  
AACAACGAAAGAACCAGAAGGCTCATGTCTGGGAGTGCATCATCAGGCACTGAAAT  
AAGGAAGGAGACACTTGGA AAAACGGGTGTGGGGGGAGTGTCCCCAGCTCTGGCTTG  
AGGTGAGAAAGGACTCTCTGGGCAGCAGGCAGCATGCCCGGTCTCCACACCTTCT  
CCTTTCTCAGAAGAGCCTGCATGGGTGGGTGGGGCTCTGCCGTGCAGCATGGGGGCCT  
ATTTAAGGCGCTCTGGTCCACCACATTGCTTACTGCAGATCCAGCCCTAGGGATGCCA  
GAGAAGAGGCTTTGTGGGTAAGTCCTGCTCCTCTCCCGGACTCAGCAGGGGAGGGTG  
ATTCTGAGTGGCTGCTTTTGTCTGTCCCTCTCCAGGGACAGTGCCTGGCTGTCACTTTA  
ATTCTCCGGCAAATGGAAGCACAGCTCAGGGAAGTTTCTCCCTCCCATTCAGCCATCCC  
CAACTCAAGATCTCTGTCCAATCGGGAGCCTTTCCAGGGGCTGACACTCCTAAGCTAC  
TGTCTTGAGACCCCCACCCACCCACACGCAGCCGAGGAAGCTTTTTCAACTGCAGA  
TATGTGCAGATATGTCATCAGGTGCAAATTTTGGCTTTTTCCCCAGTCCCTCAGCCCTC  
TAGCCCTATACTTGGCCCATCAAGAGCACATCTGGGCAGGCAACACCCAGCCCCTGC  
CAACCTCTGTGCCCCCTCCCTTCATGCTCTTGTCTTCTAGCTGTGGGATCCCATTCTCAG  
CTCCAAGCTCAGCACCCACCAGAGAGAGTGGGCAGTATTCCGAGCTCTCGGGCTATAC

TGAGTCTCAACATGTCCATGTTAGGGTGTGGAGAACATTTATAGAAGGGGGACCAAGG  
AGATGGTTCAAGGTACTTACCACAAAACCTTGACACCCTGAAGCCCACATGGTGGAATT  
GAAAAAAAAAAGATCTGATCTCACATGCCCTCTGTGCGTGTGTATGTATGTTTGACATCC  
ACAGAAGAGAGCTCTGAAGGGCGGGCAGCATCCAGGCTGAGAGAACTTTGGCCACCT  
GGCCCTGAGAACTGAATTCCATAGGCTGTGAACTCTAGCAGATGCCCTAGGGACT  
CAGTTCTGGTGCCTGGCTGTGCTACACCATCGAT

TRANSFAC professional V10.2 library

PAX8\_B: -2028bp, ccattcttGCATGgtttg  
PAX8\_01: -2027bp, cattcttgcaTGgtt  
PAX\_Q6: -1130bp, CTGTAAATAAC

**Rno-mir-146b**

TGGCCACCTGGCCCTGAGAACTGAATTCCATAGGCTGTGAACTCTAGCAGATGCC  
CTAGGGACTCAGTTCTGGTGCCTGGCTGTGCTA

**>chromosome:GRCh38:10:102433588:102436619:1**

GCTACAGGTCTGTGTCTCCGGAGGGTGGAGCCTGGGATTTTGGACGTGGTCTGGGAGA  
GGTGGAGTGGTAGCAGGTGCCAGGATGAGGATCCACCTGAGCCCTGTCATGGACAGC  
CTGTAGACCATGCCTACCCCCCGGGGCCTTCATCCCCCATGTTGGCAGGGCTGCTTGTC  
TAGGACAGGAGAGCTGAACTCCAGGGCCCAACAAGACTTCAACTTCCTCTTTTGTTC  
CTGCTGCCACAGATTCCCGGTGCTGCCCTGTGGGGAAGCCCCACAGCCCTCCCCTCTTG  
GGAACCCTGAAATGGGTCAACAAGGGGAAGAGTCCCCTTCAAGGATAAAATTTCCCATC  
CCCCATCAGCAGGGATGAGCCCTTTTATGTGCTAGTTCCTTCGTGGGGTGCTGGGGACC  
CGGAAGCTGTCCCTGCCCTCAGGGAGCTCACAGTCCAAGAGAGAAGTCCCATCTTTCC  
TCTCTCCTAGGGACTAAGGCAGTGCCAAGATACTATGCTGCAGTGGCTCACACCTGTA  
ATTCTAGCACTTTGCAAGGCTGAGGTGGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAATTTGAGAC  
CAGCCTGGGCAACATGGCAAAACCTCGTCTCTACAAAAAATTTAAAAAATAAAAAATT  
ATCTGGGCATGGTGACACACGCCAGTAGTCCCAGCTACTCCAGAGACTGAGGTGGGAG  
GATCATTTGAGCCCCAGAGGTCAAGGCTG**CAGTAAGCCGTGATT**GTGCTACTG**CACT**  
**CCAGCCTGAGT**GACAAAGCAAGACCCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
GAAGAAGAAAAGAAGGAGAAGGAAGAAGAAGAACTATGGAGAAAACGGGATGACT  
GCTTATTGCTTTCTCTTCCACCTCTGGTCCTCACAACAGCCTCCTTCTTCTGGCCTC  
AGAGACAGCAAGATGTTGGCTGCTTGGGGGAGGTAGCAGGGAAGGAAGGGGCACATT  
CGCGTCGCTTTGCCCATAAAAACACTGCCACTCCAGCCTGGTGATACTAGGGTTAATG  
AGGGGTGGGGTGACAGCGACTTTGAACTCTGGCCGGGCAGGCCCTAGGAAGGGGGT  
GATGGGCAGCCACAGCCCCAGGCCTTTGCCTGTCTCCAGAGACCAGCCATCCCTTT  
CCTCCCCCGTCCCCTTTCTGCTTCCCCCTGTCCATTGCACAATACTGATGACTCTTCTC  
TCCCTACCACCCTCCATTCCCGGAACTTTCAAGTTTCTCCTCAGTAGAGCTGCCCTGAGTT  
CTGGCCCAAGACCCCTGCAAGCCATTTCTGACTGTGTGCCTTCCCCTCTCCCCTATCCC  
CTGTTTGCTGGATGGCAGCTGCATGTGACTTGGTATCAGAAAGAACTTCCTGAGCTTTC  
AAGGGAGGAGGATGGAAAAGACTTCTTAGGGGGAGTCCCTCCTTTCCCAACTCAAAC  
CTG**GGGAGTCCCAG**CTCTGTGCAGCAGGAGTCAAGTTCTGGGGGGTTCGAGGACAGAA  
GGTGGGCTGAGGAGAGGGGAACCCACAGACACAAGGACACACATACTGTAAGGTA  
GGGGTCCCCGGGATCCCTGCCCTGAGGGATTCTGAAGCTG**CTGGAACCTCA**GCCCC  
GATTTTCTTTCCCCTCAGGTCTCAGTCTCTCTCTCCCCAAAATGGGAACAGACTCCCCA  
CTGCCCTTTGGTACTGCTTGAAGCGGCACAGAGCTAAAGGAGGCAGAGGGATGCCTTT  
TCACCGCCATTCTTCCAGTGAATTTTGCAGCTGGTGTGGGTGCCTGGATCGCCTTA  
GCTGGTGGGAAAAGCTAGAAACCTACGCTGAGGCTTCCCCTAGCACCTCCATTCCCCA

TCATCCTGCTTCAAAATGAGAACTGGACTTGAATTTGGCATAAAGGGCAGATTTTTC  
 AGGCAGAGTAGAGAGAGAGCCCAGCGGGCTGGTCTCAAGGGGTGGGAAGAACTCAGT  
 TAGAGACCAAGGTGAGGAAGGGGAGGCTTCAAAGAATGGCGGGGGCGGGGTCCCGCT  
 CTGGCTTGAGGTTAGAAAGGGCTCTCTGGGCAGGGTTCCTGGCCCTCCACACCTTCCT  
 CCTTTCTCAGAAGAGCCAGCATGGGGCGGGGGCGGGAGGCGGCTGGGGCGGGGGTGG  
 GGGCCTTATTTAAGGAGCACCGGCTGAGAACATCGTTGCAGATCCAGCCCCAGGAGCC  
 ATAGAGAGGAGGTTTCGTGGGTAAGTGGCTGTCCCTCTCTCTGGATTCAAGCAGGGGT  
 CGGGATGGGGTGCCCTGAGGCGCAGGCTTGGCTTTCCCTCTCTGGGATAGGCTGCAG  
 CTTTGCCATGTGAGTGAGGGGAGCACCCAGCCCTCGGCTGAACTCTCCAGAAAATGAA  
 AGTGTGCTTCAGGGAACCTCTTCTCCTCCACTCCACTATCCCAGGTACTTCAAATCTTT  
 ATTCAGGGTTTTGGGGAGATTTCTGGGGAGCTAGGACTCCTGGGCTGGGCTCCTATCTT  
 GGGGATCCATATCTTGGGGACTCCCTTTAGCTCAGAAAGCCCCTTGGTTTGCATAGAG  
 ATGCCCTTCTCAGTGTGCGTGTCTGGCTCTTTCCCCAGCCCCTCACCCCTCCAGCCCC  
 ACATCAGGCCCCACCAGGAACACATCTGGGCAGGAAGCGACAGATGGATCCCTGCCA  
 TGGCCCTGAGCCCCCTCCCTCTTAACCTACTCCAATTCCTGTTGGAATTTATGGAAC  
 CCGTGTCCATTTCTTAGCTGTGGGCCCCCATTTTCAGCTCCAAGCTCAGACCCTCCCTG  
 GAATAGGAGTTCTCTTGGTATCACAAGTTCCTTATGTGACCCATCCTGGGCCTCAACT  
 ACTCATCCTGGGAACGGGAGACGATTACAGAAGAAAGCATGCAAGAGCAGCGTCCA  
 GGCTGAAAGAACTTTGGCCACCTGGCACTGAGAACTGAATTCCATAGGCTGTGAG  
 CTCTAGCAATGCCCTGTGGACTCAGTTCTGGTGCCCGGCAGTGCTACAACATCAA  
 TGCCAAGGCCGTGGGGCA

TRANSFAC professional V10.2 library

PAX8\_01: -2305bp, **cagtaagccgTGatt**  
 PAX8\_01: -2281bp, **cactccagccTGagt**  
 PAX\_Q6: -1457bp, **GGGAGTCCCAG**  
 PAX\_Q6: -1305bp, **CTGGAACTTCA**  
 PAX\_Q6: +42bp, **GTGAGCTCTAG**

#### Hsa-mir-146b

**GAACTTTGGCCACCTGGCACTGAGAACTGAATTCCATAGGCTGTGAGCTCTAGCA**  
**ATGCCCTGTGGACTCAGTTCTGGTGCCCGGCAGTGCTACAACATCAATGCCAAGG**

